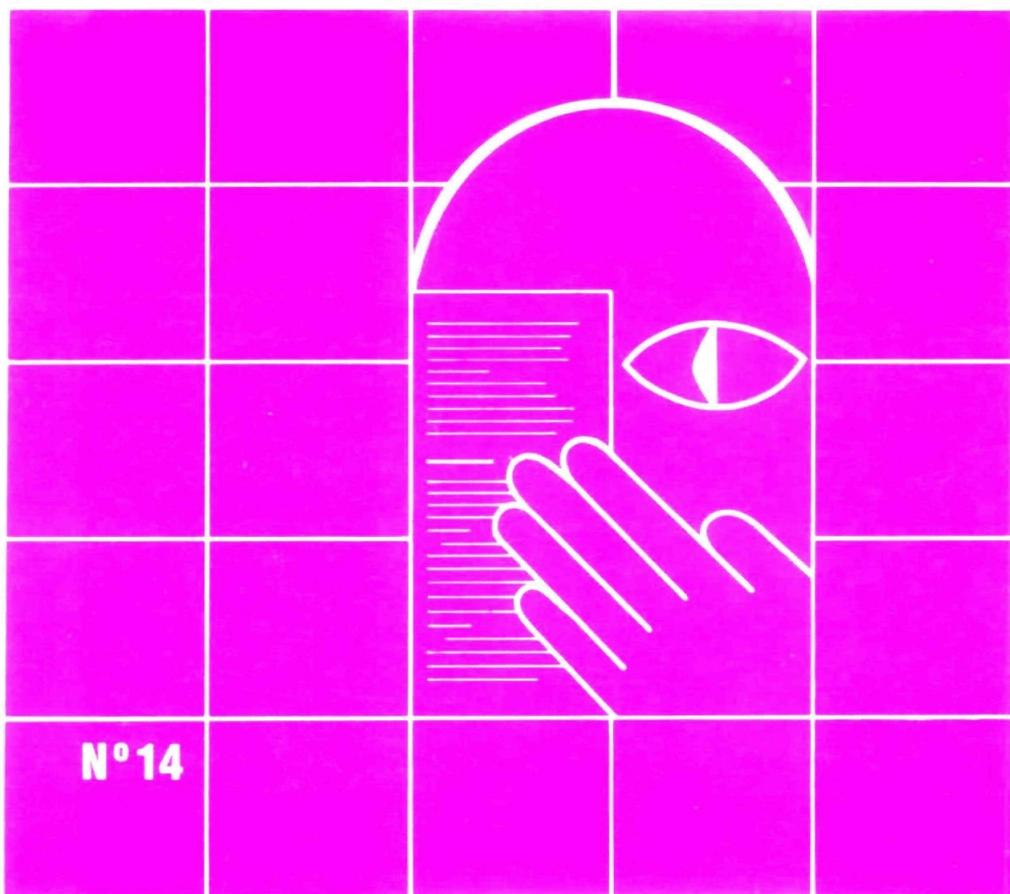


Organización Panamericana de la Salud

Anemia: hematología para un diagnóstico básico

Serie PALTEX para ejecutores de programas de salud



Anemia

Hematología para un diagnóstico básico

Serie PALTEX para ejecutores de programas de salud No. 14

Dr. Bruce L. Evatt*

Dr. S.M. Lewis, Miembro del
Real Colegio de Patólogos**

Dr. F. Lothe***

Dr. James R. McArthur****

- * Director, División de Factores Huésped, Centro de Enfermedades Infecciosas, Centros de Control de las Enfermedades, Atlanta, Georgia, USA.
- ** Hematólogo asesor y catedrático de hematología, Colegio Real de Medicina para Posgraduados y Hospital Hammersmith, Londres, Reino Unido.
- *** Médico, Tecnología de Laboratorio para la Salud, Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza.
- **** Profesor de Medicina, Médico de Cabecera y Asesor en Hematología, Director, Centro de Recursos de Aprendizaje de Ciencias de la Universidad de Washington, Seattle, Washington, USA.

Publicado conjuntamente por

MINISTERIO DE SALUD Y SERVICIOS HUMANOS DE ESTADOS UNIDOS

Servicio de Salud Pública

Centros de Control de las Enfermedades

Atlanta, Georgia 30333, USA.

y

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD, Ginebra, Suiza.

Versión en español por

ORGANIZACION PANAMERICANA DE SALUD

Copyright © Organización Panamericana de la Salud 1986

ISBN 92 75 71012 0

Todos los derechos reservados. Ninguna parte de esta publicación puede ser reproducida o transmitida en ninguna forma y por ningún medio electrónico, mecánico, de fotocopia, grabación u otros, sin permiso previo por escrito de la Organización Panamericana de la Salud.

Publicación de la
ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD
Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la
ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD
525 Twenty-third Street, N.W.
Washington, D.C. 20037, E.U.A.

1986

Se agradece el apoyo financiero prestado por las siguientes compañías para la traducción al español de este manual: Abbott International, Ltd; Latin America Area International Division; Ross Laboratories, Division of Abbott Laboratories; Bristol Meyers International Group Nutritional and Development.

Los nombres de marcas comerciales se emplean únicamente como identificación, y esto no significa que las recomiende el Servicio de Salud Pública ni el Ministerio de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos.

Índice general

	Página
Prefacio	ix
Introducción	1
Capítulo 1 Principios del diagnóstico	5
Efecto de la patofisiología en la morfología	5
Estudios sanguíneos básicos para la detección de la anemia: Determinación del Hematócrito (Hto)	
Determinación de la hemoglobina (Hb)	7
Estudios básicos para definir la causa de la anemia:	
Frotis de sangre periférica, recuento de reticulocitos, examen de la médula ósea	8
Diagnóstico de la anemia: Método práctico	13
Diagnóstico de laboratorio de la anemia macrocítica ..	15
Diagnóstico de laboratorio de la anemia microcítica hipocrómica	20
Diagnóstico de laboratorio de la anemia normocítica ..	33
Capítulo 2 Empleo del laboratorio para pruebas o encuestas de salud pública sobre la anemia nutricional	41
Capítulo 3 Control de calidad	45
Empleo de muestras “testigo”	47
Empleo de muestras de pacientes	52
Control de la morfología	54
Calibración, cuidado y mantenimiento del instrumental de laboratorio	54
Recolección de muestras	61
Anticoagulantes	62
Almacenamiento y transporte de muestras de sangre ..	63
Capítulo 4 Métodos de diagnóstico	65
Medición de la hemoglobina	65
Hematócrito:	
Micrométodo	72
Macrométodo	76
Concentración media de hemoglobina corpuscular (CHCM)	78
Recuento de reticulocitos	78
Extendidos de sangre	80
Extendidos espesos	83

Examen de la médula ósea	84
Biopsia con treфина	87
Estimación del contenido de hierro en la médula ósea	88
Detección de la metahemalbúmina	90
Detección de la hemoglobinuria	91
Prueba de lisis de la sucrosa	92
Prueba directa de globulina antihumana (de Coombs) ..	93
Prueba con azul de cresilo brillante para cuerpos de inclusión	96
Prueba eliminatória para Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa	98
Pruebas para determinar la tendencia al desarrollo de hematíes falciformes en la sangre	101
Estimación de la hemoglobina A ₂	105
Identificación electroforética de hemoglobinas anormales	107
Estimación de la hemoglobina F	109
Estimación del hierro en el suero	112
Capacidad total de fijación de hierro	114
Recuento de leucocitos	114
Recuento de plaquetas	120
Velocidad de sedimentación de eritrocitos	122
Detección de sangre oculta en heces	124
Glosario de abreviaturas	127
Material didáctico	128
Índice analítico	129

Cuadros e ilustraciones

- Cuadro 1—Niveles de hemoglobina y Hto, p. 2
Cuadro 2—Anormalidades de los glóbulos rojos, p. 10
Cuadro 3—Respuesta de los reticulocitos, p. 11
Cuadro 4—Condiciones en que se debe efectuar el examen de la médula ósea, p. 12
Cuadro 5—Causas de la anemia megaloblástica, p. 17
Cuadro 6—Anemia sideroblástica, p. 33
Cuadro 7—Anemia hemolítica, p. 35
Cuadro 8—Anemia hemolítica microangiopática, p. 36
Cuadro 9—Anemia normocítica, p. 38
Cuadro 10—Biopsia de la médula ósea, p. 39
Figura 1—Eritropoyesis, p. 5
Figura 2—Anemia macrocítica, p. 15
Figura 3—Anemia microcítica, p. 21
Figura 4—Anemia normocítica, p. 34
Figura 5—Diferencia entre exactitud y precisión, p. 45
Figura 6—Curva de distribución de Gauss, p. 48
Figura 7—Gráfica de control de calidad, p. 50
Figura 8—Método de suma acumulativa, p. 51
Figura 9—Gráfica de calibración del fotómetro, p. 59
Figura 10—Tubo de microhematócrito, p. 74
Figura 11—Hematócrito en tubo de Wintrobe, p. 77
Figura 12—Preparación de la frotis de sangre, p. 82
Figura 13—Agujas Klima y Salah, p. 86
Figura 14—Aguja Jamshidi-Swaim, p. 88
Figura 15—Preparación de células con hematíes falciformes, p. 103
Figura 16—Hemoglobinas después de la electroforesis, p. 109
Figura 17—Cámara de recuento del hemocitómetro, p. 116
Figura 18—Cámara de recuento del hemocitómetro, corte transversal, p. 119
Microfotografías: pp. 23-30.

Agradecimientos

Para escribir este libro, los autores consultaron otras publicaciones e incluyeron descripciones de métodos seleccionados de laboratorio que han aparecido en libros normales de referencia y en revistas. Por lo general, no se hace una referencia específica a éstos en el texto y deseamos en especial dar las gracias a las siguientes fuentes de información:

a. *Hematology Procedures Manual*, publicado por los Centros de Control de las Enfermedades, Atlanta, Georgia, y editado por R.M. Schmidt con la colaboración de K. Summers, C. McGrath, S. Wilson, J. Wright y E.M. Brosious.

b. *Practical Hematology* de J.V. Dacie y S.M. Lewis, 5ta. edición, publicado por Churchill Livingstone, Edinburgo y Londres, 1975.

c. *Clinical Hematology* de M.M. Wintrobe, 8va. edición, publicado por Lea & Febiger, Filadelfia, 1981.

El libro se preparó con la colaboración del Comité Permanente para Programas de Capacitación del Comité Internacional para la Normalización en la Hematología/Organización Mundial de la Salud (CINH/OMS); el comité contribuyó con papeles de trabajo que se han incorporado en parte del texto.

M. Candler Ballard tomó las microfotografías que llevan los números 5, 14, 17, 22, 36 y 46; las demás microfotografías en color provienen de la American Society of Hematology Slide Bank y se reproducen con la autorización de sus donadores (M. Petersons, J. McArthur, R. Brunning, S.M. Lewis, M. Wintrobe). Las placas en color se revelaron en el Centro de Recursos para el Aprendizaje de las Ciencias de la Salud de la Universidad de Washington.

Asimismo, deseamos agradecer la ayuda que nos proporcionó la Sociedad Internacional de Hematología, cuyo Secretario General junto a otros expertos internacionales en Hematología revisaron diversos borradores del manuscrito y nos ofrecieron valiosas sugerencias, muchas de las cuales se incluyeron en la versión definitiva. Algunos miembros de los Grupos de Expertos del CINH también revisaron varias secciones del manuscrito. No obstante, los autores se hacen responsables de la publicación final.

Deseamos agradecer a las siguientes personas y pedimos disculpas si hemos omitido los nombres de algunas que nos hayan ayudado en nuestra tarea: E.A. Accama, O.W. van Assendelft, S.J. Baker, E. Beutler, A. Bruce Tagoe, E.J. Calcagno, C.P. Engelfriet, W. Ferreira, C.A. Finch, A.F. Fleming, K. Hassan, H.R. Hussein, M. Jamra, Sil. Kim, J.C. Koedam, H. Lehmann, M.H.T. Leyssen, V.A. Lovric, D.L. Mollin, Supa Na-Nakorn, K. Al Qadhi, L. Sánchez Medal, R.M. Schmidt, B.T. Suitters, C. Sultan, J.B.A. Terlingen, Y.N. Tokarev, Bach Quoc Tayen, R.L. Verwilghen, A.H.W. Wahba, J. Wardle, P. Wasi, y M.M. Wintrobe.

El ya fallecido G. Izak contribuyó en gran medida a la preparación del manuscrito hasta que le sobrevino la muerte en marzo de 1980; el Consejo y la Secretaría del CINH y el Comité Permanente para Programas de Capacitación del CINH/OMS, donde prestara sus servicios de manera tan atinada y sabia, lo extrañan profundamente. Este libro está dedicado a su memoria.

Bruce L. Evatt
S.M. Lewis
F. Lothe
James R. McArthur

Prefacio

El programa de trabajo determinado por los Gobiernos Miembros que constituyen la Organización Panamericana de la Salud (OPS), dentro de sus actividades de desarrollo de la infraestructura y personal de salud, comprende la elaboración de nuevos tipos de materiales educacionales aplicables fundamentalmente a la formación de personal técnico, auxiliar y de la comunidad.

En cumplimiento de lo señalado por los Gobiernos, se presenta a la consideración de los interesados, dentro del marco general del Programa Ampliado de Libros de Texto y Materiales de Instrucción, la *Serie PALTEX para Ejecutores de Programas de Salud* de la cual forma parte este manual.

El Programa Ampliado (PALTEX), en general, tiene por objeto ofrecer el mejor material de instrucción posible destinado al aprendizaje de las ciencias de la salud, que resulte a la vez accesible, técnica y económicamente, a todos los niveles y categorías de personal en cualquiera de sus diferentes etapas de capacitación. De esta manera, dicho material está destinado a los estudiantes y profesores universitarios, a los técnicos y a los auxiliares de salud, así como al personal de la propia comunidad. Está orientado, tanto a las etapas de pregrado como de posgrado, a la educación continua y al adiestramiento en servicio, y puede servir a todo el personal de salud involucrado en la ejecución de la estrategia de la atención primaria, como elemento de consulta permanente durante el ejercicio de sus funciones.

El Programa Ampliado cuenta con el financiamiento de un préstamo de \$5.000.000 otorgado por el Banco Interamericano de Desarrollo (BID) a la Fundación Panamericana de la Salud y Educación (PAHEF). La OPS ha aportado un fondo adicional de \$1.500.000 para contribuir a sufragar el costo del material producido. Se ha encomendado la coordinación técnica del Programa a la oficina coordinadora del Programa de Personal de Salud que tiene a su cargo un amplio programa de cooperación técnica destinado a analizar la necesidad y adecuación de los materiales de instrucción relacionados con el desarrollo de los recursos humanos en materia de salud.

El contenido del material para la instrucción del personal que diseña y ejecuta los programas de salud, se prepara con base en un análisis de sus respectivas funciones y responsabilidades.

La *Serie PALTEX para Ejecutores de Programas de Salud* se refiere específicamente a manuales y módulos de instrucción para el personal de los ministerios y servicios de salud, siendo una selección de materiales que proporciona elementos para la formulación y desarrollo de programas de atención primaria.

Introducción

Este libro se elaboró a petición de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para ayudar a capacitar al personal de los laboratorios de hematología de los países en vías de desarrollo. El contenido se basa en necesidades identificadas en las actividades de capacitación de la OMS sobre hematología de laboratorio y está destinado a utilizarse en laboratorios intermedios. Asimismo, los médicos de los hospitales municipales, provinciales o centrales correspondientes lo encontrarán útil. Se escogió el diagnóstico de la anemia como primer tema de una serie porque representa un problema común en las clínicas médicas de todo el mundo y de gran importancia para la salud pública, en especial en los países en vías de desarrollo. Siempre que se ha estimado apropiado, se han subrayado los aspectos de salud pública.

La anemia existe cuando el nivel de hemoglobina circulante de una persona es inferior al nivel de los sujetos sanos del mismo sexo y grupo de edad que viven en el mismo ambiente (ver cuadro 1). Los tipos más comunes de anemia se deben a deficiencias nutricionales de hierro, ácido fólico y, con menor frecuencia, de vitamina B₁₂ y proteínas. Otras causas comunes de la anemia son algunos defectos congénitos en la producción de hemoglobina, a saber, anemia causada por células con hematíes falciformes, otras hemoglobinopatías y talasemia. Otras causas directas importantes de la anemia son las infecciones e infestaciones con protozoarios, en especial el paludismo y la uncinaria, y las infecciones bacterianas que pueden agravar una anemia ya existente e impedir una respuesta óptima a los hematínicos.

Como la anemia posee una gran cantidad de etiologías, presenta dos problemas al personal de laboratorio:

1. Asegurar la presencia de la anemia.
2. Definir la causa básica de la anemia.

Las pruebas de laboratorio creadas durante los últimos dos decenios han hecho posible una excelente definición y separación de muchas formas de anemia, aunque la mayor parte de estas formas no representan problemas importantes de salud pública en los países en vías de desarrollo. Además, muchas de estas técnicas requieren importantes instalaciones de laboratorio con las que no suelen contar ni siquiera los laboratorios centrales de muchos países en vías de desarrollo.

Por otra parte, en la mayoría de los casos, basta un mínimo de recursos para diagnosticar correctamente la anemia y determinar su causa básica.

En consecuencia, el principio fundamental de este libro consiste en brindar un enfoque práctico con la máxima utilización de pruebas sencillas. Se han incluido pocas pruebas que requieren procedimientos costosos, equipo com-

Cuadro 1. Límites inferiores normales de los niveles de hemoglobina y Hto

	Hemoglobina (g/l)	Hto
Infantes (a término)	136	.44
Niños, 3 meses	95	.32
Niños, 1 año	110	.36
Niños, 10-12 años	120	.38
Mujeres, no embarazadas	120	.38
Mujeres, embarazadas	130	.40
Varones	130	.40

Estos valores se refieren al nivel del mar. La Hb de los varones normales aumenta aproximadamente 10 g/l a 2 000 m (\leq 6 500 pies) y alrededor de 20 g/l a 3 000 m (\leq 10 000 pies). A altitudes intermedias se producen incrementos correspondientes.

plejo, o que son difíciles de realizar. Por el contrario, se ha puesto énfasis en lo mucho que se puede hacer incluso en laboratorios pequeños de recursos limitados. Por esto, se ha hecho hincapié en la utilidad de la morfología del extendido de sangre; de hecho, en muchos casos, la medición de la hemoglobina y el examen de un extendido de sangre pueden (con cierto adiestramiento) suministrar toda la información necesaria para identificar los tipos prevalentes de anemia, importantes para la salud pública de una región. Se ha subrayado el examen de la médula ósea porque un médico puede llevarlo a cabo con relativa facilidad y porque puede brindar información sobre la condición del hierro, así como información morfológica necesaria para efectuar el diagnóstico. Las clases de anemia se han dividido sistemáticamente en tipos macrocíticos, microcíticos y normocíticos porque consideramos que éste es el método más sencillo para el laboratorista. En la práctica, a menudo se pueden tomar atajos y es posible diagnosticar las causas de la anemia en grupos vulnerables de la población tan pronto como se detecta la anemia; empero, esto depende del conocimiento que se tenga de las causas prevalentes de la anemia, las cuales pueden requerir su determinación en cada región y grupo de población, debido a que suelen variar.

Por ejemplo, la talasemia y la anemia ferropénica suelen tener un aspecto semejante en los extendidos de sangre; pero, en una región en la que no se presenta la talasemia, es mucho más probable que un extendido hipocrómico de sangre se deba a una anemia ferropénica. De la misma manera, la gran incidencia de una hemoglobinopatía, deficiencia enzimática de los glóbulos rojos, o de paludismo en una región puede indicar una causa probable de la anemia en dicha región. En aquellas regiones en que la dieta tiene un alto

contenido de folatos (por ejemplo, plátanos) sería más probable que una anemia megaloblástica se debiera a una deficiencia de vitamina B₁₂ que a una deficiencia de folatos. A menudo, en una misma persona pueden coexistir diversas causas de la anemia y, por ende, se dificulta el diagnóstico.

En un capítulo de este libro (p. 41) se habla exclusivamente de cómo determinar las prevalencias. Además de ayudar al diagnóstico de la anemia en casos individuales, la información concerniente a la prevalencia es de gran importancia para la salud pública porque constituye la base de todas las decisiones tomadas respecto a las medidas preventivas, tales como brindar un tratamiento suplementario a ciertos grupos de la población (por ejemplo, a las mujeres embarazadas) o el fortalecimiento de los alimentos. La misma metodología se emplea también para comprobar la eficacia de tales medidas.

En el texto se ha hecho hincapié en el control de la calidad, que con frecuencia se descuida o se practica de manera inadecuada, porque la hematología de laboratorio con fiable depende del buen control de la calidad.

El análisis detallado de la fisiología y bioquímica de los glóbulos rojos está fuera del alcance de este libro; no obstante, se incluyen breves comentarios al respecto, ya que el conocimiento de la fisiología de los glóbulos rojos normales ayuda a correlacionar los cambios morfológicos que experimentan los glóbulos rojos y los resultados de otras pruebas básicas con las causas de la anemia.

Como se trata fundamentalmente de un libro práctico, no se hace referencia a la literatura. Se les sugiere a los lectores que consulten cualquiera de los muchos libros de texto que existen y las diferentes publicaciones del Comité Internacional para la Normalización en la Hematología (CINH) en las que se describen los métodos y preparaciones de referencia del CINH que se mencionan en el texto. A solicitud de los interesados, se pueden obtener reimpressiones de estas publicaciones.

CAPITULO 1

Principios del diagnóstico

Efecto de la patofisiología en la morfología

Los eritroblastos, precursores de los glóbulos rojos, se derivan de las células madre de la médula ósea (figura 1). Normalmente, los eritroblastos sufren cuatro divisiones celulares para producir 16 células hijas, que maduran, expulsan el núcleo y se convierten en reticulocitos. Con cada división celular, las células hijas se vuelven más pequeñas que sus progenitoras y presentan un cambio progresivo de color de azul a rojo a medida que aumenta el contenido de hemoglobina y disminuye el contenido de ácido ribonucleico (ARN) de los ribosomas. Este proceso se encuentra bajo el control de una hormona, la

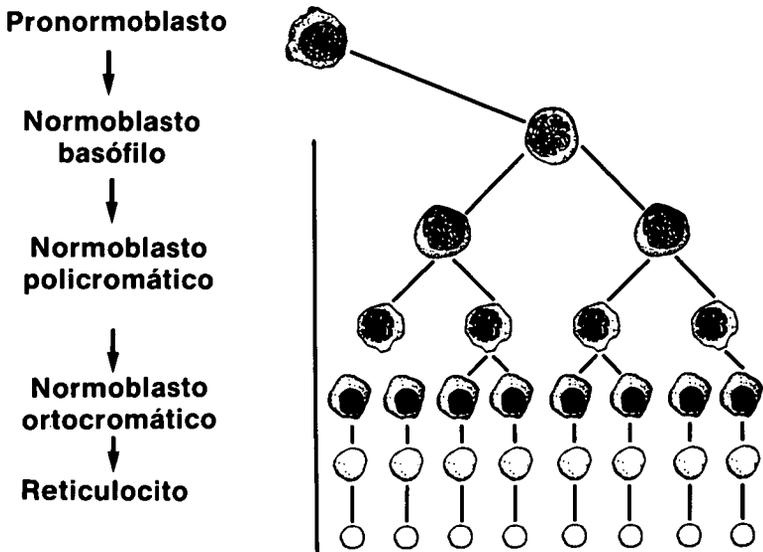


Fig. 1. Eritropoyesis. El pronormoblasto deriva de una célula madre comprometida.

eritropoyetina. En una persona sana, se ajusta la velocidad básica de este proceso de maduración para mantener el hematócrito (Hto) y la concentración de hemoglobina (Hb) de la sangre periférica dentro de los niveles normales. En los pacientes que padecen anemia a causa de un hemólisis o una pérdida aguda de sangre, hay un incremento de la eritropoyetina circulante y un aumento subsecuente del número de células que se dividen. Con este estímulo, siempre y cuando haya una cantidad suficiente de hierro, aumenta la cantidad de Hb por célula, así como el tamaño de la célula. Los reticulocitos “estimulados” salen antes de la médula y se los identifica por ser más grandes (macrocíticos) y más azules (policromatófilos). En ocasiones, a tales macrocitos policromatófilos se les da el nombre de eritrocitos “desviados”.

Si la anemia es muy severa, el estímulo a la producción de glóbulos rojos puede ser suficiente para que éstos lleguen a la sangre periférica antes de haber expulsado el núcleo (glóbulos rojos nucleados).

La anemia producida por diferentes causas suele conducir a distintas conclusiones relativas a la morfología que se describirán más adelante. El ácido fólico, la vitamina B₁₂ y el hierro son nutrientes importantes de los glóbulos rojos, necesarios para la ordenada maduración de las células; la deficiencia de cualquiera de ellos produce cambios morfológicos reconocibles en el glóbulo rojo adulto. Así, por ejemplo, el ácido desoxirribonucleico (ADN), el material que constituye los cromosomas, debe replicarse o duplicarse para que la célula se divida. Si el ADN no puede replicarse durante la fase de síntesis del ADN de la división celular, ésta se retrasa. Esta anomalía se presenta cuando existe una deficiencia relativa o absoluta de ácido fólico o de vitamina B₁₂, ya que estas sustancias actúan como coenzimas en la síntesis del ADN. En consecuencia, la síntesis de ADN se queda retrasada respecto al crecimiento de la célula y, cuando la célula produce finalmente el ADN necesario para la división, el citoplasma ya ha crecido demasiado, por lo que el producto final es un glóbulo rojo de gran tamaño (macrocito).

El citoplasma de los glóbulos rojos está compuesto, en su mayor parte, de hemoglobina. Las anomalías en la síntesis de la hemoglobina afectan el aspecto del citoplasma y, por ende, al glóbulo rojo. La hemoglobina se compone de dos partes básicas, una cadena proteínica de globina y el anillo hem, el cual contiene hierro. Si la producción de cualquiera de estos dos elementos es anormal, se reduce la producción de hemoglobina; algunos ejemplos son la anemia ferropénica, la anemia sideroblástica (condición en la que se bloquea la adecuada incorporación y utilización del hierro) y la talasemia (anomalías genéticas en las que se reduce la producción de globina). Los glóbulos rojos que se producen en estas tres condiciones son pequeños, distorsionados y pálidos (microcíticos e hipocrómicos).

Estudios sanguíneos básicos para la detección de la anemia:

Determinación del hematócrito (Hto)

Determinación de la hemoglobina (Hb)

Antes de evaluar el estado de un paciente que se cree tiene anemia, el laboratorio de hematología debe determinar en primer lugar la presencia y severidad de la anemia. Los niveles de Hto y de Hb se emplean para efectuar esta determinación. Como cada una de estas mediciones suministra información ligeramente diferente, es preferible que se realicen las dos, aunque la medición de una u otra suele ser suficiente por lo menos para establecer la presencia y la severidad de la anemia.

Determinación del hematócrito (Hto)

El Hto se expresa como el volumen de glóbulos rojos por el volumen de sangre, y se obtiene mediante la centrifugación de sangre venosa o capilar anticoagulada y la medición de las cantidades relativas de glóbulos rojos aglomerados y de plasma. El procedimiento es sencillo, se puede repetir, y ha resultado ser de gran valor para estimar el grado de anemia, sin importar las alteraciones de tamaño, forma y espesor de los glóbulos rojos que se presentan en las distintas clases de anemia. En el cuadro 1 se presentan los límites inferiores normales de Hto en hombres, mujeres y niños de diferentes grupos de edad.

En ocasiones, el examen del plasma que se encuentra sobre los glóbulos rojos en el tubo de Hto puede brindar valiosa información en cuanto a la causa básica de la anemia. Una gran cantidad de bilirrubina en el suero, como la que se observa en pacientes con anemia hemolítica y megaloblástica, se notará como un plasma muy amarillo. Cuando se trata de deficiencia de hierro o inflamación, el plasma suele ser más pálido de lo normal. Una capa de células grisáceas sobre los glóbulos rojos aglomerados suele indicar un recuento elevado de glóbulos blancos o de plaquetas.

Determinación de la hemoglobina

Esta prueba se emplea también para evaluar la presencia y severidad de la anemia (cuadro 1). Se han propuesto diversos métodos para estimar la concentración de hemoglobina en la sangre; el grado de confiabilidad varía de acuerdo con el método, y la elección de éste se basa a menudo en la disponibilidad de equipo y en el grado de exactitud que se necesite para una determinada aplicación. El método más fiable, y el que se recomienda emplear siempre que sea posible, es el método de la cianohemoglobina (ver p. 65). Este método presenta muchas ventajas, tales como 1) la disponibilidad

de un estándar satisfactorio y 2) la capacidad de evaluar todas las formas de hemoglobina clínicamente importantes. Es el método fundamental para estudios científicos, sobre todo para determinar la prevalencia de la anemia en las encuestas de salud pública. En el diagnóstico normal se pueden emplear otros métodos, tales como el ensayo con oxihemoglobina (ver p. 68), aunque es preciso reconocer sus deficiencias. Dichos métodos siempre se deben calibrar y controlar tomando como referencia el método de la cianohemoglobina.

Estudios básicos para definir la causa de la anemia:

Frotis de sangre periférica, recuento de reticulocitos, examen de la médula ósea

Una vez que se ha establecido la presencia de anemia, el laboratorista debe tratar de determinar la naturaleza y la causa de ésta. Para ello, es necesario efectuar otras pruebas: el frotis de sangre periférica, el recuento de reticulocitos, la cantidad de hierro en el suero y, siempre que sea posible, la capacidad de saturación de hierro, así como, en algunos casos especiales, el examen de la médula ósea.

Frotis de sangre periférica

El examen del frotis de sangre periférica constituye una de las pruebas de laboratorio más importantes para la evaluación de la anemia. Aunque esta sencilla prueba suministra valiosa información, suele pasarse por alto. Es de vital importancia que los frotis de sangre sean de la más alta calidad, ya que de lo contrario se obtendrá poca información o, lo que es más importante, los artificios pueden suministrar información falsa y, en consecuencia, conducir a un diagnóstico equivocado. En la página 80 se presenta el procedimiento para preparar y teñir el extendido de sangre.

El examen debe efectuarse de manera sistemática a fin de no pasar nada por alto. Revise la etiqueta; examine todo el extendido mediante inspección directa; a continuación, coloque una gota de líquido para montaje (o aceite de inmersión) sobre el extendido de sangre y cubra con un cubreobjetos; después, examine el extendido de sangre a bajo aumento (X100-200) para evaluar la calidad del extendido (esto es, distribución uniforme de los glóbulos blancos, pequeñas colas sin colgajos, y el número y la distribución de las plaquetas) y estimar aproximadamente el número de glóbulos blancos y plaquetas. Con este aumento se pueden observar, si están presentes, microorganismos de gran tamaño, como larvas de filaria o tripanosomas; asimismo, se pueden buscar

glóbulos rojos nucleados y glóbulos blancos anormales. A continuación, examine el extendido con alto aumento sin inmersión (X400) para evaluar el número y tipos de glóbulos blancos y determinar si existen glóbulos rojos nucleados, glóbulos blancos anormales o hemocitoblastos.

Con este aumento del preparado se puede realizar el análisis con relativa rapidez; este aumento también se emplea para determinar la morfología de los glóbulos rojos y la presencia y número de plaquetas. También se pueden observar, y hay que buscarlos, los parásitos que causan el paludismo—sobre todo si existe la posibilidad de una infección palúdica.

Por último, examine el extendido en aceite de inmersión. Se pueden observar las características detalladas de la morfología de los glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas, y se puede confirmar la presencia de parásitos que causan el paludismo. En las regiones en que está presente la infección con *Borrelia*, es posible detectar a la *Spirochaeta* responsable.

La morfología de los glóbulos rojos debe evaluarse en el área del portaobjetos donde la mayor parte de los glóbulos rojos se tocan pero no se superponen (ver las microfotografías 1-24). El observador debe determinar si los glóbulos rojos son macrocíticos, microcíticos o normocíticos. El pequeño linfocito maduro constituye un excelente medio para comparar el tamaño, ya que su núcleo tiene 7-8 μm de diámetro, el mismo tamaño de un glóbulo rojo normal. Asimismo, se deben hacer observaciones para determinar la uniformidad, la variación en el tamaño (anisocitosis) o la variación en la forma (poiquilocitosis). Hay que tomar nota de las formas anormales, tales como células “blanco”, células espinosas, acantocitos, células fragmentadas (esquistocitos), células falciformes y esferocitos. Posteriormente, los glóbulos rojos se deben examinar para determinar la presencia de cuerpos de inclusión, tales como fragmentos nucleares (cuerpos de Howell-Jolly), ribosomas agregados (punteado) o parásitos del paludismo. También es preciso tomar nota de las células pálidas (hipocromía), de la variación de color de las células (policromasia) y de la falta de color uniforme. Estas diversas anomalías identificables se asocian con ciertas enfermedades, que se enumeran en el cuadro 2 y se ilustran en las microfotografías 1-24.

Recuento de reticulocitos

Los reticulocitos son glóbulos rojos juveniles que aún contienen restos de ácido ribonucleico y de ribosomas. Este material se tiñe con ciertos colorantes. En la página 78 se describe el procedimiento para efectuar el recuento de reticulocitos. Normalmente de 0,2% al 2% de los glóbulos rojos circulantes son reticulocitos. Cuando la eritropoyesis aumenta como resultado del estímulo originado por la anemia (por ejemplo, en la hemólisis), se incrementa

el recuento de reticulocitos. Si la médula ósea no funciona de manera adecuada (como, por ejemplo, en la anemia aplásica o nutricional), se obstaculiza la eritropoyesis y el recuento de reticulocitos será inferior al

Cuadro 2. Anormalidades de los glóbulos rojos

Morfología anormal	Estados clínicos asociados
Macroцитos	Anemia megaloblástica (deficiencia de folato o de vitamina B ₁₂), enfermedad del hígado, reticulocitos
Microesferocitos	Esferocitosis hereditaria, anemia hemolítica inmunológica, enfermedad de la Hb C, esplenectomía, sangre almacenada, quemaduras
Microцитos	Deficiencia de hierro, talasemia, anemia sideroblástica
Ovalocitos (eliptocitos)	Ovalocitosis hereditaria, talasemia, anemia perniciosa, anemia ferropénica, mielofibrosis
Células falciformes	Hb S, otras variantes de Hb
Células “blanco”	Hb C, talasemia, Hb S, enfermedad del hígado, Hb E, deficiencia de hierro, esplenectomía
Esquistocitos (células fragmentadas)	Anemia hemolítica microangiopática, talasemia, anemia hemolítica producida por drogas, anemia hemolítica mecánica
Células espinosas (células espiculares)	Anemia hemolítica microangiopática, enfermedad del hígado
Hipocromía	Deficiencia de hierro, talasemia, anemia sideroblástica; algunas veces en la anemia producida por inflamación crónica
Policromatofilia	Anemia hemolítica, hipoxia, anemia mieloptísica, anemia megaloblástica, pérdida aguda de sangre
Punteado basófilo	Envenenamiento con plomo, talasemia
Cuerpos de Howell-Jolly (residuos nucleares)	Anemia hemolítica, anemia magaloblástica, esplenectomía
Anillos de Cabot	Anemia megaloblástica, envenenamiento con plomo
Cuerpos de Heinz	Deficiencia de G6FD, lesiones producidas por drogas o toxinas, hemoglobina inestable, Hb H, esplenectomía
Siderocitos o sideroblastos	Anemia sideroblástica, esplenectomía
Acantocitos	A-β lipoproteinemia

esperado según el grado de anemia. La adecuada respuesta al tratamiento se puede evaluar por el incremento en el recuento de reticulocitos. Empero, el recuento relativo de reticulocitos expresado en forma de porcentaje suele ser engañoso ; es mejor calcular el recuento absoluto de reticulocitos, aunque para ello es preciso conocer el recuento total de glóbulos rojos. Si se desconoce este último, se puede obtener una estimación del recuento real de reticulocitos, corregido para la anemia, multiplicando el recuento que se haya obtenido mediante la siguiente fórmula (ver p. 78):

$$\frac{\text{Hto}}{0,45} \text{ ó } \frac{\text{Hb}}{150}$$

Otro factor que hay que tener en cuenta al evaluar la producción real de glóbulos rojos es el tiempo de maduración de los reticulocitos en el sistema circulatorio. Este “tiempo de maduración” es en realidad el tiempo necesario para que los reticulocitos pierdan su estroma teñible y, por lo general, es de un día. Sin embargo, en casos de anemia severa, con frecuencia son liberados antes de tiempo y permanecen en circulación como reticulocitos durante dos o tres días antes de perder el retículo y convertirse en glóbulos rojos maduros. En circunstancias semejantes, es necesario dividir el recuento observado de reticulocitos por el tiempo de maduración (en días) para obtener un índice de reticulocitos. En el cuadro 3 se presenta la respuesta normal de los reticulocitos a la anemia cuando la médula funciona correctamente.

Cuadro 3. Respuesta esperada de los reticulocitos en diferentes grados de anemia*

Hematócrito	45	40	35	30	25	20	15
Niveles de Hb	15	13,3	11,7	10	8,3	6,6	5
Rec. retic. (%)	1	2	5	10	15	20	30
Rec. correg. retic.	1	1,8	4	7	8,3	9	10

* Estas cifras, que sólo se deben tomar como una guía aproximada, indican el nivel de respuesta cuando la médula ósea funciona normalmente.

Examen de la médula ósea

La aspiración y biopsia de la médula ósea puede ser de gran utilidad para el diagnóstico de la anemia; empero, debe subrayarse que el examen de la médula ósea es secundario a un buen examen de frotis de sangre periférica. En general, la sangre periférica y los hallazgos clínicos deben suministrar una

clave de diagnóstico respecto a lo que cabe esperar de un examen de la médula ósea. El examen de la médula ósea se emplea casi siempre para confirmar el diagnóstico de la enfermedad, y sólo debe efectuarse para obtener un diagnóstico exacto.

Por lo común, el examen de la médula ósea puede dar un diagnóstico de las condiciones enumeradas en el cuadro 4, aunque también brinda valiosa información en otras condiciones. En la página 84 se describe la técnica para examinar la médula ósea.

Las normas que se aplican a la calidad de la preparación del extendido de sangre periférica también se aplican a la preparación de la médula ósea. Los frotis de médula ósea deben ser de buena calidad; el frotis se tiene que examinar de manera sistemática, primero por inspección directa y después a bajo aumento (X 100-200). Con el bajo aumento, el laboratorista puede evaluar la celularidad de la muestra y ver si es heterogénea (es decir, si está constituida por elementos normales de la médula ósea) u homogénea (es decir, si contiene células de un solo tipo, que podrían indicar una leucemia). La celularidad varía según la edad del paciente; en la primera infancia, la médula normalmente contiene poca grasa; en los adultos, la médula suele tener cerca de 50% de células de grasa, aunque puede tener hasta un 70%; y en las personas mayores, puede tener hasta un 75% de grasa. Con el bajo aumento se puede observar con facilidad el número de megacariocitos.

Cuadro 4. Condiciones en que el examen de la médula ósea puede servir para efectuar el diagnóstico

1. Anemia megaloblástica
 2. Leucemia
 3. Anemia ferropénica*
 4. Ciertos trastornos metabólicos
(por ejemplo, enfermedad de Gaucher)
 5. Mielofibrosis
 6. Anemia aplástica
 7. Anemia diseritropoyética
 8. Anemia sideroblástica
 9. Anemia producida por infección
 10. Mieloma múltiple y otros tumores
hematológicos malignos
 11. Tumor metastásico
-

* También requiere examen de la tinción de hierro

También es posible identificar, si están presentes, células tumorales, que tienden a aparecer en colgajos. A menudo se pueden observar los patrones anormales que indican la presencia de alguna enfermedad cuando se examina la médula a bajo aumento. Después de examinar todo el portaobjetos con bajo aumento, se debe examinar la médula con alto aumento sin inmersión y con aceite de inmersión. Se debe tomar nota del número de células eritroides y mieloides, y después se debe analizar la morfología de los precursores de los glóbulos rojos para ver si no se han producido cambios megaloblásticos o de otro tipo. Es preciso evaluar la maduración de los elementos de los glóbulos blancos y megacariocitos. Si la médula se examina de esta forma detallada y sistemática, se obtendrá una gran cantidad de información útil.

Diagnóstico de la anemia: Método práctico

El diagnóstico de la causa de la anemia se debe llevar a cabo paso a paso, incluyendo la información obtenida de las evaluaciones clínica y de laboratorio iniciales. Los pasos fundamentales son:

1. Evaluación de la información clínica obtenida de la revisión de la historia clínica y de un examen físico.
2. Evaluación de los estudios básicos de sangre, que incluyen Hb, Hto, recuento de reticulocitos y examen del frotis de sangre periférica.
3. Determinación de la cantidad de hierro en el suero (y capacidad total de saturación de hierro) en caso de que se disponga de estas pruebas y de que se pueda confiar en ellas.
4. Examen, cuando sea necesario, de aspirado de médula ósea.
5. Procedimientos especializados de laboratorio cuando sea necesario para efectuar un diagnóstico definitivo. Es posible que algunos de estos procedimientos exijan recurrir a un laboratorio central.

A menudo, es difícil encontrar la causa de la anemia porque el paciente puede presentar una combinación de condiciones, todas las cuales pueden contribuir a la anemia. De esta manera, por ejemplo, un paciente con talasemia puede presentar también una anemia nutricional o una infección. Con frecuencia, la anemia megaloblástica y la anemia ferropénica se presentan juntas; empero, en general predomina un factor que indica cuál es la causa principal de la anemia. Resulta poco práctico brindar una descripción detallada de todas las combinaciones y alteraciones posibles que se producen cuando existen diversas etiologías. Por lo tanto, en este libro sólo se presenta el método sistemático. No obstante, recuerde que una respuesta inesperadamente poco satisfactoria a una terapia antianémica específica suele indicar que la anemia tiene más de una causa.

Historia clínica

Esta información es de gran valor para determinar la dirección de los estudios posteriores; por ejemplo, la anemia encontrada en niños mal nutridos o en pacientes que llevan una dieta insuficiente indica una causa nutricional. Un antecedente de ictericia señala un posible proceso hemolítico o una infección parasitaria, por ejemplo, paludismo. La ingestión de ciertas drogas, la exposición a productos químicos tales como los líquidos limpiadores que se emplean en el hogar, o la presencia de una enfermedad renal preexistente señalan a estos factores como causas de la anemia. Una historia de hemorragia (ginecológica, gastrointestinal) indica que la causa de la anemia puede ser una deficiencia de hierro. Con frecuencia, las historias familiares y sociales que incluyen consideraciones étnicas y geográficas, contienen información valiosa que puede ser importante para indicar el diagnóstico más probable. Ciertas tradiciones, antecedentes genéticos, exposiciones y dietas pueden relacionarse con problemas determinados de salud. La información sobre la frecuencia de una forma determinada de anemia en una región se puede obtener en ocasiones de encuestas previas sobre salud pública, que revelen problemas nutricionales, genéticos o de enfermedades infecciosas (empero, es necesario que en las encuestas se haya empleado una metodología adecuada y que hayan sido estadísticamente válidas).

Examen físico

El examen físico también puede suministrar información de gran importancia: por ejemplo, la palidez, los hematomas, el estado de shock, el bazo palpable, los ganglios linfáticos agrandados y la ictericia se relacionan con tipos identificables de enfermedades clínicas. De igual manera, en la anemia producida por células falciformes y en la talasemia suelen presentarse úlceras en la parte inferior de las piernas. Ciertas anomalías neurológicas residuales, que suelen acompañar a una crisis de células falciformes que afecten al sistema nervioso central o a una larga deficiencia de vitamina B₁₂, pueden indicar el diagnóstico. Sin embargo, se debe subrayar que este libro no es un tratado clínico; el internista que desee obtener información detallada sobre el aspecto clínico de los pacientes debe consultar los libros normales de texto sobre hematología clínica.

Estudios iniciales de laboratorio

Una vez que se ha evaluado la información clínica y que se han obtenido las primeras impresiones, el laboratorista debe determinar si existe una anemia y decidir qué dirección deben seguir las pruebas posteriores. El examen del frotis de sangre periférica puede ser de gran ayuda para determinar dicha

orientación, al igual que la obtención de índices fiables de glóbulos rojos. El tamaño de los glóbulos rojos es con frecuencia decisivo, ya que diferentes tipos de anemia se clasifican como macrocíticas, microcíticas o normocíticas, dependiendo del tamaño de los glóbulos rojos.

Diagnóstico de laboratorio de la anemia macrocítica

(Ver figura 2)

Frotis de sangre

Si los glóbulos rojos de un paciente son macrocíticos, es decir, son predominantemente más grandes que el núcleo de los pequeños linfocitos maduros de la sangre periférica, el laboratorista debe tener en cuenta tres causas principales: 1) anemia megaloblástica (producida por una deficiencia

PRUEBA DE LABORATORIO

INTERPRETACION

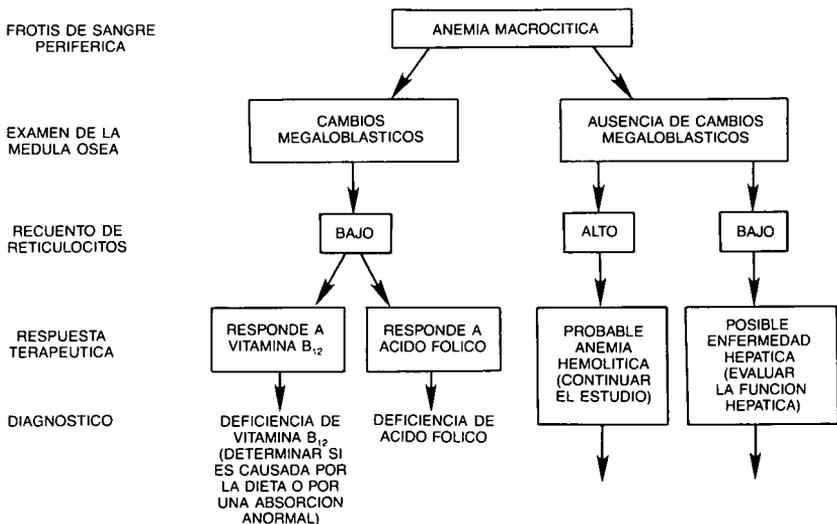


Fig. 2 Esquema para investigar pacientes con anemia macrocítica. Ésta figura representa un método conveniente para el diagnóstico de este tipo de anemia. Sólo debe servir de guía y quizá sea necesario hacerle algunas modificaciones para que se adapte a las condiciones o recursos locales.

de vitamina B₁₂ o de ácido fólico, o de ambos), 2) enfermedad del hígado, o 3) condiciones que presentan un gran número de reticulocitos en circulación.

A menudo, otras características de la sangre periférica resultan útiles para distinguir estas causas de macrocitosis; por ejemplo, si la causa es una deficiencia de ácido fólico o de vitamina B₁₂, es probable que el frotis de sangre presente trombocitopenia y leucopenia. Es característico que existan leucocitos hipersegmentados (polimorfonucleares) que contienen seis o más lóbulos nucleares. Además, se presenta una tendencia hacia la hipersegmentación, y más del 5% de los leucocitos polimorfonucleares tienen cinco o más lóbulos. Los glóbulos rojos presentan una gran variación en tamaño y forma, y muchos tienen un aspecto distorsionado y anormal. Se pueden ver los cuerpos de Howell-Jolly, al igual que otras inclusiones o punteados anormales de los glóbulos rojos. A veces se verá un megaloblasto en circulación. Si estas características morfológicas están presentes, el laboratorista debe seguir el método para diagnosticar una anemia megaloblástica que se describe en las páginas 18 y 19. En casos menos severos de anemia megaloblástica, es posible que sólo la macrocitosis esté presente. Si también existe una deficiencia de hierro, suele observarse un aspecto dismórfico.

La morfología de los glóbulos de un paciente con enfermedad del hígado posee características diferentes. Como norma, los glóbulos rojos son menos macrocíticos y tienden a ser más uniformes en forma y tamaño. A menudo se encuentran grandes células “blanco”. Con estos hallazgos, el laboratorista debe evaluar la función del hígado. Empero, cuando se observan macrocitos, *es preciso* sospechar que existe una anemia megaloblástica, a menos que la aspiración de la médula indique lo contrario (figura 2).

La tercera causa de glóbulos rojos macrocíticos es una marcada reticulocitosis. Los reticulocitos, también conocidos como eritrocitos desviados, son responsables de la macrocitosis; se les identifica por su policromatofilia y, con frecuencia, por un punteado basófilo muy fino que se aprecia en el citoplasma. Esta condición puede confirmarse con facilidad efectuando un recuento de reticulocitos, ya que en las otras dos condiciones que producen células macrocíticas, el recuento de reticulocitos es normal o bajo. Si el recuento de reticulocitos es elevado, el laboratorista debe tener en cuenta los procesos hemolíticos que se mencionan más adelante en “diagnóstico de laboratorio de la anemia normocítica” (ver p. 33).

Investigación de la posibilidad de una anemia megaloblástica

En el cuadro 5 se presentan las causas más comunes de la anemia megaloblástica. El 95% de los casos se deben a deficiencia de ácido fólico o de vitamina B₁₂, y en los países en vías de desarrollo, la deficiencia nutricional

Cuadro 5. Causas de la anemia megaloblástica

1. Deficiencia de ácido fólico
 - a. dieta inadecuada
 - b. alcoholismo
 - c. esteatorrea o esprue
 - d. otras causas de mala absorción, incluyendo gastrectomía parcial
 - e. embarazo y lactancia
 - f. leucemia, mielofibrosis y anemia hemolítica crónica
 2. Deficiencia de vitamina B₁₂
 - a. anemia perniciososa
 - b. gastrectomía
 - c. esprue
 - d. deficiencia dietética prolongada
 - e. parásitos (*Diphyllobothrium latum*)
 3. Anemia megaloblástica causada por drogas
 - a. 6-mercaptopurina
 - b. 5-fluoruracilo
 - c. arabinosido de citosina
 - d. alcaloides derivados de la pervinca
 - e. difenilidantoína
 - f. compuestos antifolatos
 4. Trastornos congénitos (muy raros)
 - a. oroticuria
 - b. anemia diseritropoyética congénita
 - c. anemia perniciososa juvenil
 5. Leucemia
 6. Síndrome de Di Guglielmo
-

es la causa principal de estas condiciones. Menos común, aunque también se debe considerar, es la deficiencia que resulta de la mala absorción causada por esprue o una flora bacteriana o parásitos anormales en el intestino. Otra causa de la anemia megaloblástica es la carencia de factores intrínsecos necesarios para asegurar la absorción de la vitamina B₁₂; ésta es la causa de la “anemia perniciososa” clásica.

Fuentes de vitamina B₁₂ y ácido fólico

En general, las plantas no sintetizan *vitamina B₁₂*, aunque algunas bacterias sí lo hacen. En consecuencia, los vegetarianos estrictos o los pacientes que sólo ingieren una dieta vegetal, sin duda llegarán a ser deficientes en vitamina B₁₂. Si bien algunas bacterias del intestino grueso pueden producir vitamina B₁₂, ésta no se absorberá desde ahí porque el sitio de absorción se

localiza en el fleon terminal del intestino delgado. Los alimentos que tienen un contenido más alto de vitamina B₁₂ son el hígado y los riñones, aunque otras carnes, productos lácteos, aves, pescados y mariscos también contienen grandes cantidades. El *ácido fólico* se encuentra en la mayor parte de los alimentos; los vegetales verdes, el hígado y la levadura son especialmente ricos en ácido fólico, si bien la ebullición puede destruir la actividad de la vitamina, sobre todo si es prolongada y con pH ácido.

Examen de la médula ósea para confirmar el diagnóstico

Cuando la sangre periférica indica un diagnóstico de anemia megaloblástica, éste se debe confirmar mediante una aspiración de la médula. La muestra de médula en esta condición será hiper celular. Se puede apreciar un incremento en los elementos eritroides y una acumulación de formas eritroides precoces, debida a la muerte selectiva de las formas maduras incapaces de completar su proceso de maduración. El hallazgo morfológico que sirve de base al diagnóstico es la disociación entre la maduración nuclear y citoplasmática del eritroblasto. El núcleo conserva un aspecto primitivo (a menudo contiene nucleolos) a pesar de que en el citoplasma existe una cantidad suficiente de hemoglobina. De hecho, la persistencia de un núcleo con nucleolos en una célula en la que ha comenzado la producción de hemoglobina indica que la maduración nuclear se ha retardado. El núcleo presenta un aspecto abierto de granulación fina, dado que estas células han crecido más a causa del retraso en la división celular. La serie granulocítica presenta metamielocitos gigantes y de forma anormal (ver microfotografías 1-48).

Diferenciación de la deficiencia de vitamina B₁₂ y de la deficiencia de ácido fólico

En la inmensa mayoría de los países en vías de desarrollo, los pacientes con anemia megaloblástica suelen presentar deficiencia de vitamina B₁₂ o de folatos. En general, el tipo de deficiencia (es decir, de ácido fólico o de vitamina B₁₂) se puede determinar con un alto grado de probabilidad a partir de los antecedentes dietéticos del paciente, la información clínica y el conocimiento de la prevalencia de estas deficiencias en la población local.

No obstante, para dar un diagnóstico definitivo, es necesario medir el ácido fólico en el suero y en los glóbulos rojos, el nivel de vitamina B₁₂ en el suero y, posiblemente, efectuar una prueba radiactiva de absorción de vitamina B₁₂. Estas pruebas requieren muchos más recursos de los que suele haber en un laboratorio básico y, en caso de que lleguen a efectuarse, sólo se llevan a cabo en los grandes laboratorios centrales. Si se cuenta con un laboratorio central capaz de efectuar los ensayos de B₁₂ y folato, se debe sacar sangre al paciente

antes de comenzar el tratamiento, y enviarla al laboratorio. Con este fin se extraen cerca de 10 ml de sangre sin contaminación bacteriana; parte de esta sangre se mezcla con EDTA (anticoagulante) y se mantiene fría (4°C), el resto de la sangre se deja coagular y se quita el suero sin contaminación. El suero se almacena frío (congelado, si es posible) hasta que se examina. Si el paciente recibe antibióticos, se invalidan algunos métodos de ensayo con B₁₂ y folatos. La prueba radiactiva de absorción de B₁₂ requiere arreglos especiales para obtener las dosis del isótopo que se administrará al paciente y que un laboratorio central efectúe la medición de la radiactividad presente en la orina o plasma del paciente.

Tratamiento y ensayos terapéuticos

El cuadro clínico del paciente suele indicar si se debe administrar folato o B₁₂. Cuando el diagnóstico no es claro, un ensayo terapéutico puede resultar útil para diferenciar las dos causas de la anemia. Si el paciente está gravemente enfermo, tiene una hemoglobina de menos de 40g/l, se encuentra en las últimas fases del embarazo o padece una enfermedad neurológica, el tratamiento debe tener preponderancia sobre el diagnóstico. Se deben tomar muestras de sangre, como se mencionó anteriormente, para los últimos ensayos y hay que administrar al paciente grandes dosis terapéuticas de folato y B₁₂. Para verificar la respuesta al tratamiento, es preciso efectuar recuentos sanguíneos, incluyendo reticulocitos, en el 3°, 6°, 10°, 14° y 21° días después del tratamiento. Si el paciente no responde de manera adecuada al tratamiento, quiere decir que el paciente no padece anemia megaloblástica o que ésta está complicada con deficiencia de hierro o con una infección.

Puede llevarse a cabo un ensayo terapéutico cuando el tratamiento es menos urgente; empero, el ensayo toma tiempo y quizá sólo valga la pena realizarlo en un hospital grande y en condiciones ideales en que al paciente se le puedan evaluar con frecuencia los recuentos de hemoglobina y reticulocitos. El ensayo terapéutico *no debe* efectuarse en pacientes críticamente enfermos, es decir, en presencia de angina de pecho, ataque cardíaco o trombocitopenia con hemorragia. En condiciones óptimas, la prueba se efectúa de la siguiente manera:

El paciente continúa con su dieta normal y se le administran 0,2 g de ácido fólico al día por vía oral. La respuesta de los reticulocitos se observa diariamente durante una semana. Si no hay respuesta o si ésta no es adecuada, se trata al paciente con 1 a 2 µg de vitamina B₁₂ al día, administrada por medio de una inyección intramuscular y se observa la respuesta de los reticulocitos y de los demás parámetros de recuento sanguíneo.

La presencia de reticulocitos a partir del tercer día, que alcanza su punto máximo al sexto o séptimo día, con un incremento de 10 g/l en la hemoglobina y recuentos normales de leucocitos y plaquetas después de siete días, indica una respuesta completa al ensayo terapéutico.

Si sólo se obtiene una remisión parcial con el ácido fólico, el ensayo con B₁₂ no se debe retrasar más de una semana.

Preparaciones terapéuticas

El ácido fólico suele venir en tabletas de 5 mg. Esta tableta es soluble en agua y no se puede dividir en la dosis correcta para el ensayo. Existen tabletas que contienen 100–350 µg y están combinadas con hierro; son adecuadas para el ensayo, siempre y cuando la investigación hematológica preliminar haya excluido la deficiencia de hierro como causa de la anemia.

En general, la vitamina B₁₂ viene en ampollas de 200 ó 250 µg/mg y se puede administrar en dosis de 200–1000 µg.

Diagnóstico de laboratorio de la anemia microcítica hipocrómica

(Ver figura 3)

Extendido de sangre

Si durante la evaluación inicial del extendido de sangre periférica el laboratorista encuentra que los glóbulos rojos son más pálidos o pequeños de lo normal, debe tener en cuenta las causas comunes de la anemia microcítica hipocrómica: deficiencia de hierro, talasemia y anormalidades en el metabolismo del hierro. Si bien el extendido de sangre puede dar algunos indicios acerca de las probables causas, las anormalidades morfológicas no resultan tan útiles como en el caso de la anemia macrocítica. Por ejemplo, en la anemia ferropénica, los glóbulos rojos suelen ser hipocrómicos y microcíticos, pero el grado en que se presentan estas anormalidades depende del nivel de Hb o de Hto. Un paciente con anemia ferropénica puede tener un frotis normal de sangre hasta que su Hto cae por debajo de 34% ó 35% y la Hb por debajo de 100 a 110 g/l. En este punto, un observador cuidadoso puede detectar una microcitosis moderada. Con valores de Hto de 30% y de Hb de menos de 100 g/l, la microcitosis es evidente y se puede observar hipocromía. Una indicación útil es que las células hipocrómicas presentan un área central pálida mayor que la mitad del diámetro de la célula. Si el Hto del paciente es de menos de 27% y la Hb de menos de 90 g/l, la hipocromía y la microcitosis serán notables con un incremento en la anisocitosis, poiquilocitosis, unas

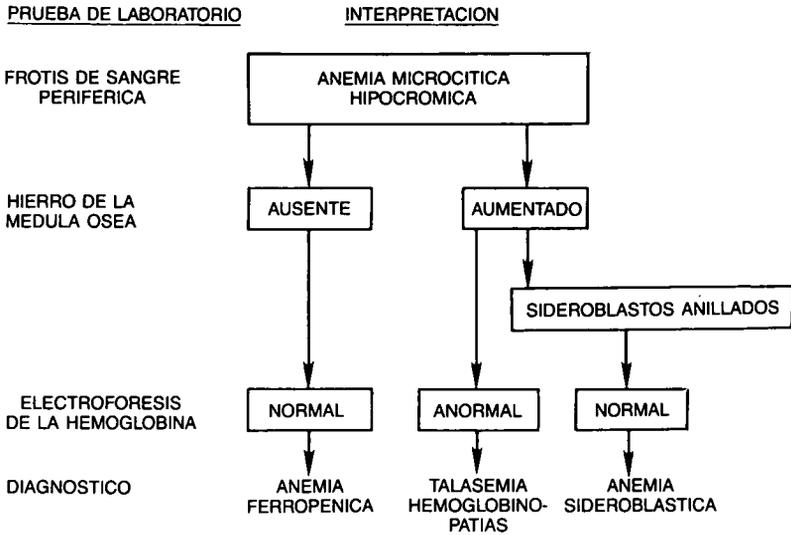


Fig. 3. Esquema para investigar pacientes con anemia microcítica hipocrómica. Esta figura representa un método conveniente para el diagnóstico de este tipo de anemia. Sólo debe servir de guía y quizá sea necesario hacerle algunas modificaciones para que se adapte a las condiciones o recursos locales.

cuantas células “blanco” y formas alargadas y elípticas. Con frecuencia, el recuento de plaquetas es elevado. Si se presenta una hemorragia aguda con la deficiencia de hierro, también se pueden observar los eritrocitos desviados (ver microfotografías 5 y 6), aunque se reduce la capacidad de producir reticulocitos en comparación con la de pacientes que tienen reservas normales de hierro.

Los pacientes que presentan talasemia o ciertas hemoglobinopatías suelen tener extendidos de sangre muy semejantes, aunque el grado de anormalidad de los glóbulos rojos también depende de la severidad de la anemia y, por ende, del tipo de talasemia. Por ejemplo, en los extendidos de sangre de algunos pacientes con talasemia, sobre todo de la forma heterocigótica, los glóbulos rojos microcíticos pueden ser la única anormalidad morfológica y quizá sea difícil diferenciar el extendido de otro que indique la presencia de una deficiencia de hierro. Sin embargo, en el caso de talasemia severa (homocigótica), los extendidos de sangre muestran anormalidades sorprendentes que no suelen observarse en la deficiencia de hierro. Los glóbulos rojos

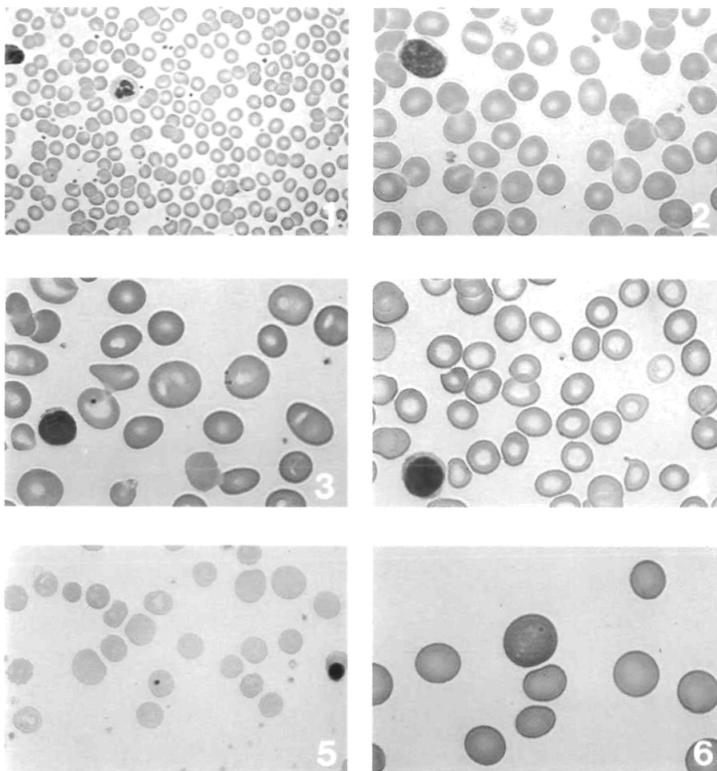
son notoriamente microcíticos e hipocrómicos, con extrañas variaciones en tamaño y forma. Las células “blanco” constituyen entre el 5% y el 30% de los glóbulos rojos; se pueden observar glóbulos rojos nucleados y eritrocitos desviados. En la talasemia se pueden observar con frecuencia células con punteado basófilo grueso; a menudo, el recuento de reticulocitos es elevado (hasta 8%), así como el de leucocitos y el de plaquetas.

La tercera causa de la anemia microcítica hipocrómica es la incapacidad de utilizar el hierro de manera adecuada para producir hem. A la anemia causada por esta incapacidad se le da el nombre de anemia sideroblástica. Puede ser congénita o secundaria a diversos procesos patológicos que producen distintos niveles de bloqueo en la síntesis de hem. No obstante, en todas las causas los cambios morfológicos son muy similares. Si bien los hallazgos encontrados en los frotis de sangre de los casos severos pueden resultar útiles para distinguir este grupo, las formas moderadas suelen ser muy difíciles de diferenciar de la deficiencia de hierro o la talasemia. Es notable la variación en tamaño y forma de los glóbulos rojos. En general, los glóbulos rojos parecen ser dimórficos, es decir, compuestos de dos poblaciones, una más o menos normocrómica y normocítica, y la otra hipocrómica y microcítica. En los casos graves, se observan muchas células “blanco” muy pálidas. Es característico que éstas y otras células contengan pequeños grupos de tres o cuatro gránulos gruesos (un tipo de punteado grueso). Cuando el extendido de sangre se tiñe con coloración de hierro, se observa que los gránulos punteados contienen hierro.

Investigación posterior de pacientes de anemia hipocrómica

El diagnóstico definitivo de la causa de la anemia hipocrómica suele requerir un examen de la médula ósea, electroforesis de la hemoglobina y otras pruebas especializadas, sobre todo la determinación de la cantidad de hierro que está presente en el suero. Sin embargo, se puede predecir el diagnóstico más probable conociendo la historia clínica y las características físicas del paciente, así como la situación de salud pública que prevalece en la zona. Si los recursos del laboratorio no incluyen la determinación de hierro en el suero, resulta práctico suponer que la deficiencia de hierro sea la causa probable de la anemia hipocrómica, con la condición de que se satisfagan las siguientes condiciones básicas:

1. El extendido de sangre indica, o es compatible con, una anemia ferropénica.
2. El paciente tiene una razón evidente para tener anemia ferropénica, por ejemplo, carencia dietética o una fuente conocida de hemorragia (tal como uncinaria o un posible tumor gastrointestinal).



Todos los extendidos son con aceite de inmersión excepto cuando se indica que se usó un bajo aumento.

Sangre normal

1. Extendido de sangre normal (bajo aumento). Buena separación de las células, neutrófilo normal cerca del centro del cuadro, plaquetas normales.

2. Extendido de sangre normal. Glóbulos rojos ligeramente más pequeños que el núcleo de un linfocito; palidez central normal.

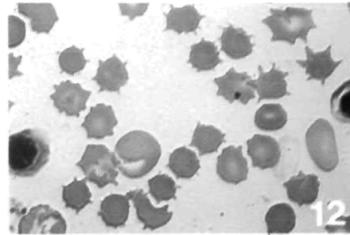
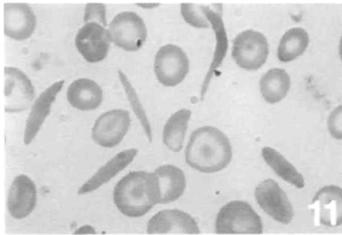
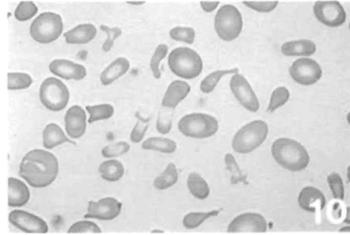
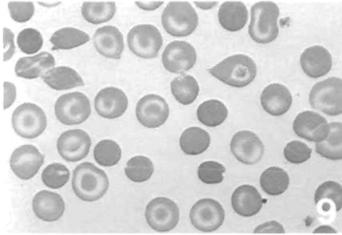
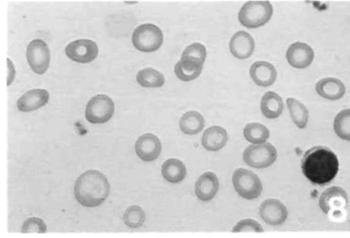
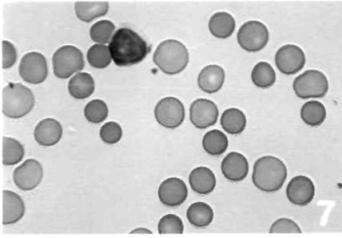
Anormalidades de la sangre periférica

3. Macroцитos. Gran cantidad de glóbulos rojos mayores que el núcleo de un linfocito. Ovalocitos presentes.

4. Microцитos. Gran cantidad de glóbulos rojos mucho más pequeños que el núcleo de un linfocito. (El incremento en la palidez central indica hipocromía.)

5. Eritrocitos policromáticos "desviados" (bajo aumento). Varias células grandes y de color gris azulado; también un glóbulo rojo nucleado.

6. Eritrocito policromático "desviado". La célula que aparece en el centro del campo contrasta con los glóbulos rojos más pequeños y normales.



7. Esferocitos. Estos glóbulos rojos son más pequeños y densos que los normales; ausencia de palidez central.

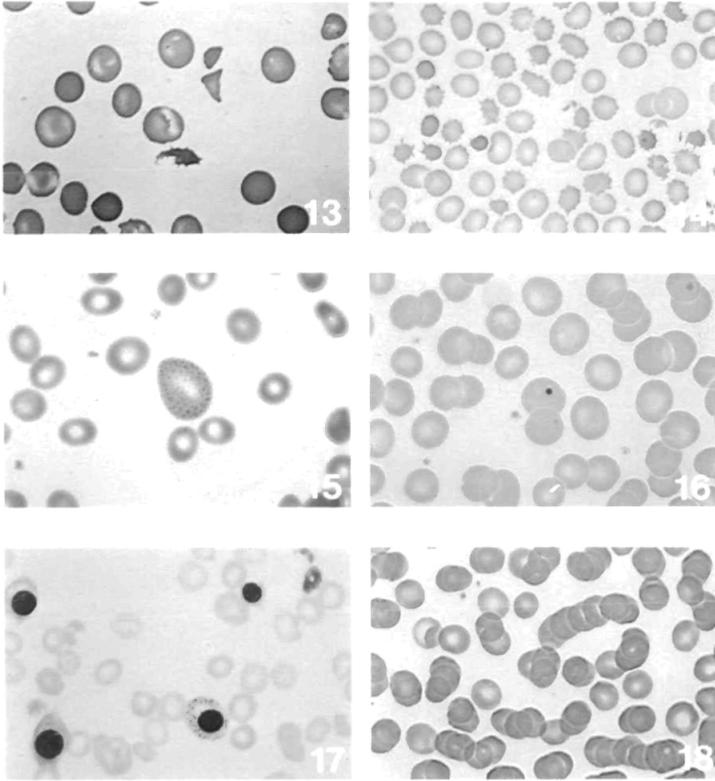
8. Glóbulos rojos hipocrómicos. Glóbulos rojos que presentan una cantidad insuficiente de hemoglobina; el estrecho contorno de hemoglobina hace que la palidez central sea más grande que la mitad del diámetro del glóbulo rojo.

9. Células "blanco". Casi la mitad de los glóbulos rojos que aparecen en este campo presentan el aspecto característico de blanco u ojo de buey.

10. Anisocitosis y poiquilocitosis. Variaciones extremas en tamaño (anisocitosis) y en forma (poiquilocitosis).

11. Células falciformes. Cinco glóbulos rojos alargados característicos, algunos con extremos puntiagudos.

12. Acantocitos. Por lo común cada célula presenta de 5 a 10 espículos delgados, largos e irregularmente espaciados.



13. Esquistocitos. Tres fragmentos de glóbulos rojos (esquistocitos) en el centro del campo; dos presentan distorsión triangular.

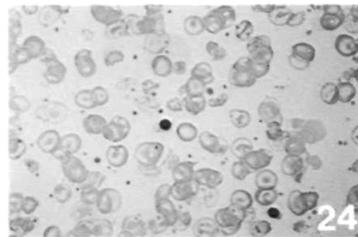
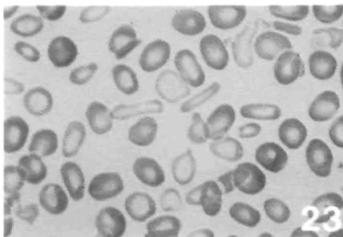
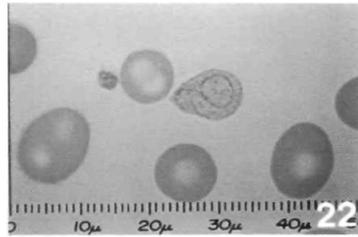
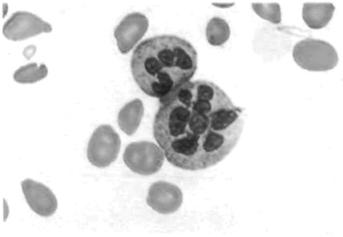
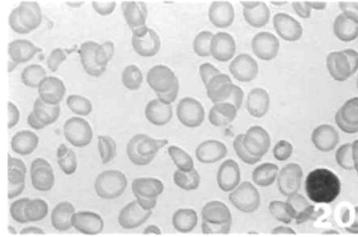
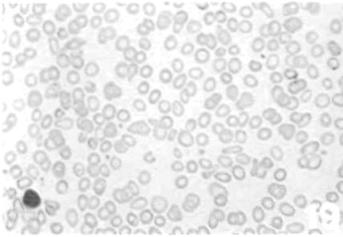
14. Equinocitos o “células espinosas”. Es característico que cada célula presente de 10 a 30 proyecciones cortas y regularmente espaciadas.

15. Basofilia punteada. El glóbulo rojo de gran tamaño que aparece en el centro presenta una gran cantidad de inclusiones basófilas, que le da un aspecto de punteado.

16. Cuerpo de Howell-Jolly. El glóbulo rojo del centro presenta una sola inclusión basófila redonda característica cerca de la periferia.

17. Glóbulos rojos nucleados o normoblastos. Cuatro de tales células con núcleos condensados.

18. Rollos (Roleaux). “Cordones” alargados de glóbulos rojos pegados reflejan ciertas anomalías proteinicas.



Condición de la sangre periférica en distintas etapas de la enfermedad

19. Anemia ferropénica (bajo aumento). Observe la *microcitosis* (en comparación con el núcleo del linfocito), la *hipocromía* (incremento de la palidez central) y *anisocitosis* y *poiquilocitosis* (variaciones de tamaño y forma).

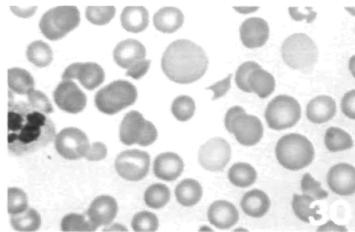
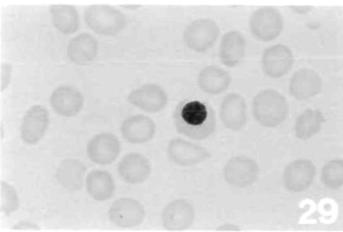
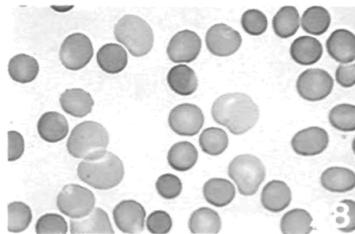
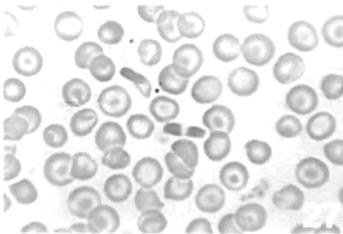
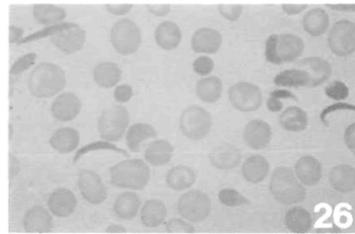
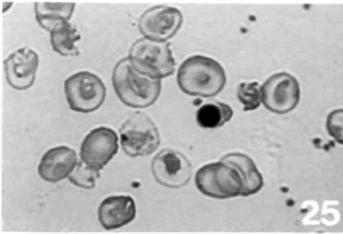
20. Anemia ferropénica. Microcitosis, hipocromía, anisocitosis y poiquilocitosis con mayor detalle.

21. Anemia perniciosa. Macrocitosis y ovalocitosis; en el centro del campo aparecen neutrófilos hipersegmentados muy grandes.

22. Anemia perniciosa. En el glóbulo rojo central aparece una inclusión de un anillo de Cabot; también macrocitosis y ovalocitosis.

23. Anemia sideroblástica. Una población normocrómica y una hipocrómica de glóbulos rojos; anisocitosis y poiquilocitosis leves.

24. Beta talasemia homocigótica (bajo aumento). Las anomalías incluyen células "blanco", hipocromía, microcitosis, anisocitosis, poiquilocitosis, dos glóbulos rojos nucleados y trombocitosis.



25. Beta talasemia homocigótica. Anormalidades semejantes a las del No. 24; también un cuerpo de Howell-Jolly en el centro del campo.

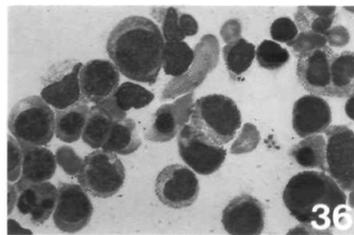
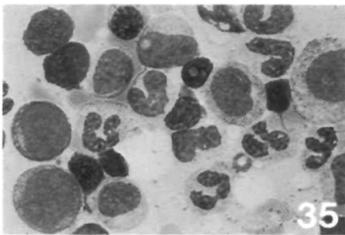
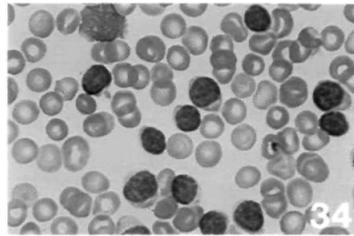
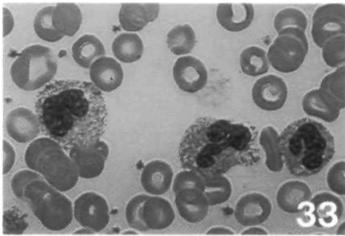
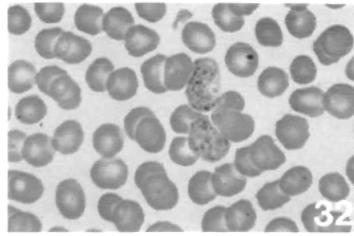
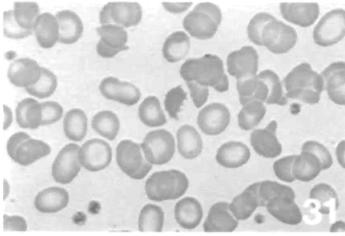
26. Enfermedad de células falciformes. Cuatro "células falciformes" alargadas anormales, dos de las cuales presentan formas "falciformes" puntiagudas características; también células "blanco", anisocitosis y poiquilocitosis.

27. Enfermedad de la hemoglobina C. Glóbulo rojo central rectangular con hemoglobina C convertida en gel en ambos extremos; células "blanco" abundantes.

28. Esferocitosis hereditaria. Las células anormales no tienen palidez central; se ven esféricas en el extendido de sangre; también cuatro células "desviadas" más grandes y grises.

29. Mielofibrosis. El glóbulo rojo nucleado que aparece en el centro tiene dos células adyacentes en forma de lágrima.

30. Anemia hemolítica microangiopática. Esquistocitos característicos; anisocitosis y poiquilocitosis leves y policromatofilia "desviada".



31. Cuerpos de Heinz por hemólisis causada por drogas. En el área central derecha un glóbulo rojo deformado que parece tener dos "mordiscos" refleja la perforación esplénica de glóbulos de hemoglobina desnaturalizada.

32. Paludismo causado por *Plasmodium vivax*. Dos glóbulos rojos parasitados en el centro, un cuerpo de Howell-Jolly en una célula adyacente; rollos pequeños.

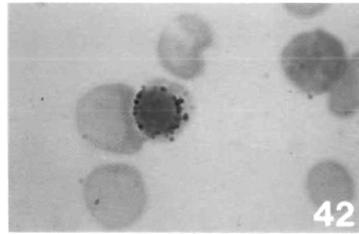
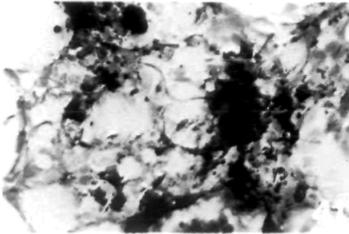
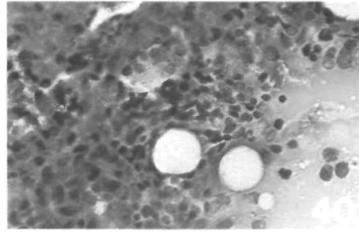
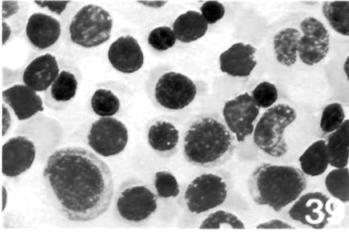
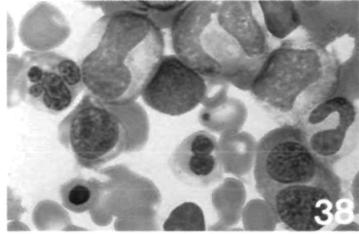
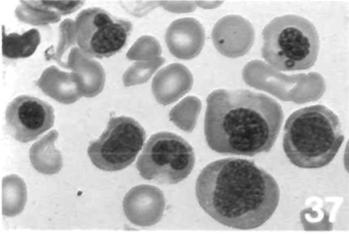
33. Infección aguda con neutrofilia. Tres granulocitos con fuerte granulación tóxica y formación de vacuolas; incremento de las plaquetas.

34. Leucemia linfocítica crónica. Linfocitosis marcada sin infección evidente; los linfocitos parecen muy semejantes.

Médula ósea normal y anormal

35. Médula ósea normal. Maduración ordenada desde los mieloblastos (esquina inferior izquierda) hasta los granulocitos más maduros; población más pequeña de cinco normoblastos que se reconocen por la mayor condensación de la cromación nuclear.

36. Hiperplasia eritroide de la anemia hemolítica. En esta médula hiperplástica, que presenta en su mayoría normoblastos, la relación normal de 1:3 entre eritrocitos y mielocitos se invierte con creces.



37. Anemia megaloblástica. Los precursores megaloblásticos de los glóbulos rojos presentan una cromatina nuclear "abierta" característica; maduración nuclear retardada en comparación con el citoplasma; mitosis anormal y restos nucleares.

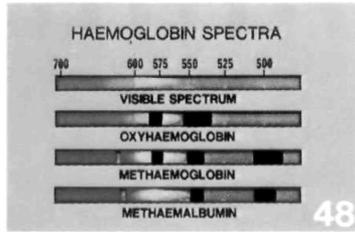
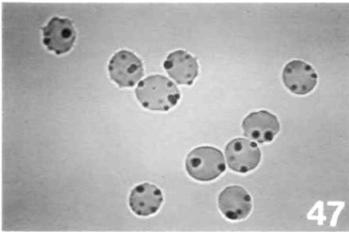
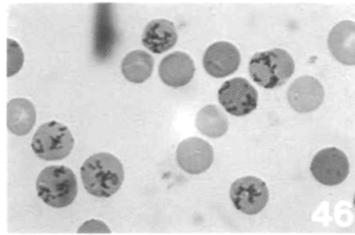
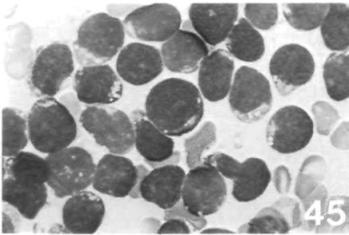
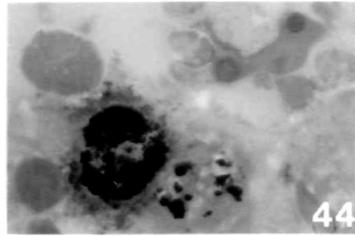
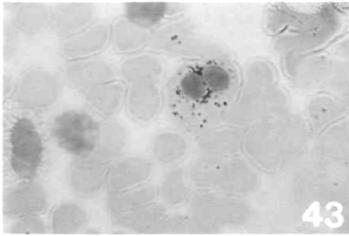
38. Anemia megaloblástica. La mayoría de los megaloblastos tienen más de un núcleo; en la parte superior del campo, tres "metamielocitos gigantes".

39. Anemia ferropénica. Gran cantidad de normoblastos en el campo; la mayoría presenta citoplasma anormal escaso.

40. Anemia ferropénica (bajo aumento). No hay hierro en esta preparación de tinción.

41. Anemia sideroblástica (bajo aumento). Notorio incremento en las reservas de hierro (hierro reticuloendotelial), representado por la coloración azul a azul verdosa.

42. Anemia sideroblástica. "Sideroblasto anillado", normoblasto con una mitocondria incrustada en un anillo anormal de hierro alrededor del núcleo.



43. Talasemia (preparación de hierro). Cantidad anormalmente grande de hierro en todo el citoplasma de este normoblasto; contraste con el sideroblasto anillado (No. 42) en que la acumulación de hierro se restringe a la mitocondria perinuclear.

44. Anemia producida por inflamación crónica (preparación de hierro). Se pueden ver cantidades masivas de hierro como masas oscuras en las células reticuloendoteliales; poco o nada de hierro en el normoblasto.

45. Leucemia aguda. En la leucemia linfoblástica los blastos leucémicos sustituyen a la médula normal.

46. Tinción de reticulocitos. En esta preparación, la reticulina de los glóbulos rojos juveniles fija el azul de metileno; incremento de los reticulocitos; tomado de un paciente con anemia hemolítica.

47. Preparación de los cuerpos de Heinz. La globina desnaturalizada está fijada a la cara interna de la membrana de los glóbulos rojos. Las anomalidades se tiñen con bromocresol verde o bromocresol azul.

48. Los números indican la longitud de onda en nanómetros (nm). (Tomado de Levinson SA, MacFate RP. *Clinical Laboratory Diagnosis*, 1969.)

Si se cumplen estas condiciones, se le puede hacer al paciente un ensayo terapéutico con hierro. El ensayo debe consistir en administrar el equivalente de 300 mg de sulfato ferroso tres veces al día durante cuatro semanas. A un paciente que presente hemorragia producida por un posible tumor en el tracto gastrointestinal, se le puede dar hierro de inmediato, aunque esto no debe por ningún motivo retrasar la investigación del diagnóstico. Si hay respuesta de los reticulocitos con un incremento de la Hb*, se efectúa el diagnóstico; en caso contrario, es necesario realizar más estudios. En una zona donde prevalece la talasemia, es importante no insistir con este tratamiento porque un ensayo prolongado con hierro puede ser perjudicial para los pacientes que tienen talasemia. No obstante, a menudo fracasan los ensayos porque el paciente no toma el medicamento prescrito.

Médula ósea

El examen de la médula ósea constituye un instrumento de diagnóstico para separar la deficiencia de hierro de las demás categorías de anemia hipocrómica; debe efectuarse siempre y cuando se pueda interpretar de manera fiable, y si la información que se puede obtener ayuda a efectuar el diagnóstico. Por definición, la deficiencia de hierro significa que la médula ósea no posee reservas de hierro. Esta ausencia suele determinarse tiñendo la preparación de la médula ósea con coloración de hierro (ver p. 88). Tanto en la talasemia como en las condiciones de empleo anormal del hierro, las reservas de hierro son superiores a las normales. Además, si se examina con cuidado la preparación con coloración de hierro, se puede obtener otra información útil para revisar el diagnóstico.

NOTA: El laboratorista debe estar consciente de que un diagnóstico de deficiencia de hierro no da fin al proceso de diagnóstico. La anemia ferropénica significa una ingestión inadecuada de hierro, o un incremento en el empleo de hierro (como en el embarazo o pérdida de sangre). Si el paciente con deficiencia de hierro ha tenido una ingestión dietética apropiada, es preciso encontrar e identificar la causa de la pérdida de sangre. En todos los varones adultos que presenten deficiencia de hierro, cualquiera que sea su dieta, es necesario buscar la fuente de la hemorragia. Asimismo, el laboratorista debe recordar que la anemia hipocrómica de un paciente puede tener más de una causa, por ejemplo, la coexistencia de una pérdida de sangre provocada por uncinaria, malnutrición y hemoglobinopatía.

* En los pacientes que presentan una pérdida continua de sangre, puede haber una respuesta de los reticulocitos sin una mejoría paralela en la Hb y en el Hto.

Otras pruebas para diagnosticar la anemia microcítica hipocrómica

Hierro en el suero

La prueba de hierro en el suero (ver p. 112) resulta muy útil para determinar la causa de la hipocromía. La cantidad de hierro en el suero es normalmente de 13–32 $\mu\text{mol/l}$ (0,7–1,8 mg/l). Disminuye en el caso de anemia ferropénica y de infecciones crónicas, y aumenta en pacientes con talasemia, hemoglobinopatía o anemia sideroblástica, así como en pacientes a los que se les han hecho muchas transfusiones de sangre.

Capacidad de fijación de hierro

Cuando se puede efectuar de manera fiable, la capacidad total de fijación de hierro (que mide indirectamente la transferrina) suele suministrar información valiosa. Esta capacidad aumenta en el caso de una anemia ferropénica y disminuye en el caso de talasemia, anemia hemolítica y anemia causada por infecciones crónicas. Los métodos para evaluarla se basan en la saturación del plasma con hierro y en la eliminación del exceso de hierro que no ha formado enlaces, por medio de absorción (por ejemplo, con carbonato de magnesio) y calculando después la cantidad de hierro presente en el suero saturado con hierro. No existe ninguna forma plenamente satisfactoria de asegurar que se ha eliminado todo el hierro que no ha formado enlaces. El CINH (British Journal of Haematology 1978, 28, 281, 281–290) recomienda un método bastante confiable.

Electroforesis de la hemoglobina

La determinación de la Hb A₂ y de la Hb F es en extremo útil para diferenciar la talasemia del empleo anormal de hierro, y deben ser las pruebas finales de la evaluación general, es decir, hay que utilizarlas si el paciente presenta una anemia hipocrómica asociada con un incremento en las reservas de hierro de la médula. La β -talasemia presenta patrones elevados de Hb A₂ y Hb F; empero, la α -talasemia, una anomalía genética que resulta de una disminución en la síntesis de otra parte de la molécula de hemoglobina, se puede pasar por alto, ya que no se observan cambios característicos en los patrones electroforéticos de la Hb A, Hb A₂ ni Hb F. En ocasiones, estos casos se pueden identificar examinando los extendidos de sangre de los miembros de la familia del paciente para ver si los hallazgos morfológicos son semejantes o, en ciertos casos, demostrando la presencia de Hb H que aparece en los extendidos teñidos con azul de cresilo brillante (ver. p. 96).

El empleo anormal de hierro (anemia sideroblástica) tiene muchas etiologías diferentes; puede ser congénito, aunque en la mayoría de los casos es adquirido (ver cuadro 6).

Cuadro 6. Anemia sideroblástica

1. Hereditaria—asociada con el sexo
 2. Adquirida
 - a. primaria
 - b. secundaria
 - i. leucemia mieloide, mieloesclerosis, policitemia, síndrome de Di Guglielmo, mieloma
 - ii. anomalías de la vitamina B₆—quimioterapia antituberculosa, enfermedad celíaca, alcoholismo, otros defectos de enzimas mitocondriales
 - iii. bloqueo a nivel mitocondrial de la síntesis de hem—envenenamiento con plomo, cloranfenicol
 - iv. ideopática—artritis reumatoide, carcinoma, anemia megaloblástica, fenacetina
-

Diagnóstico de laboratorio de la anemia normocítica

(Ver figura 4)

Estudios iniciales de laboratorio

Estos tipos de anemia se dividen en dos categorías generales, las que presentan un incremento en la producción de glóbulos rojos y las que presentan una reducción en la producción de glóbulos rojos. El frotis de sangre suministra información útil, ya que el incremento en la producción de glóbulos rojos se asocia frecuentemente con glóbulos rojos grandes y policromatófilos. El recuento de reticulocitos es la prueba básica para dividir a los pacientes en los dos grupos.

NOTA: El nivel de reticulocitos esperado depende del funcionamiento normal de la médula ósea y aumenta conforme disminuye el nivel del Hto.

Anemia normocítica asociada con un recuento elevado de reticulocitos (anemia hemolítica y pérdida aguda de sangre)

Pérdida aguda de sangre

La pérdida aguda de sangre que se produce de repente o durante un período relativamente corto (2–6 semanas) se puede asociar con una anemia normocítica y normocrómica y con reticulocitosis, siempre y cuando la médula posea una capacidad normal para aumentar la producción. En general, la historia clínica o el examen físico brindan pruebas suficientes de la pérdida de sangre (menorragia, hematemesis, melena, trauma, etc.). Sin embargo, en

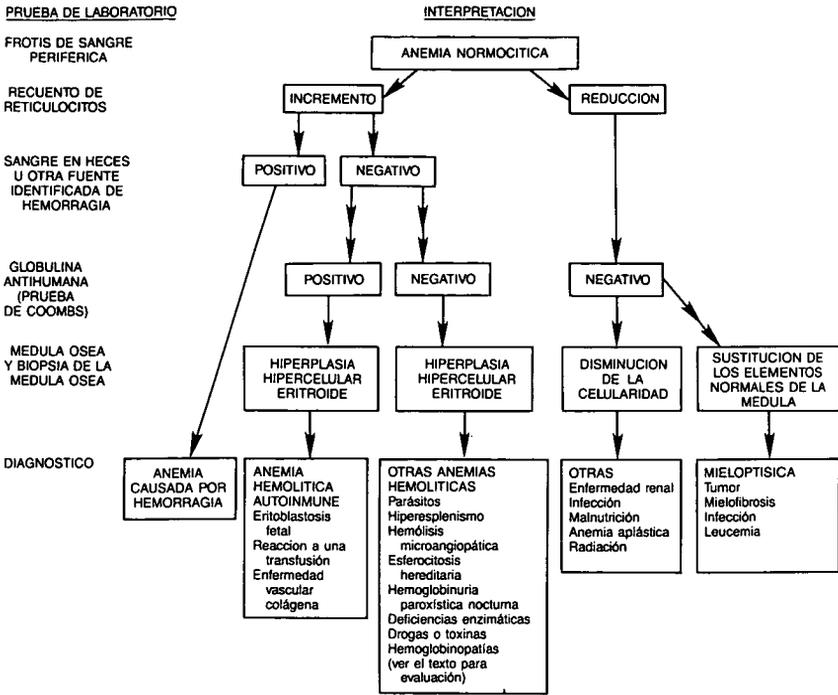


Fig. 4. Esquema para investigar pacientes con anemia normocítica.

Esta figura representa un método conveniente para el diagnóstico de este tipo de anemia. Sólo debe servir de guía y quizá sea necesario hacerle algunas modificaciones para que se adapte a las condiciones o recursos locales.

ocasiones las pruebas son menos claras y es preciso efectuar el diagnóstico de la pérdida de sangre mediante una evaluación clínica más profunda.

Anemia hemolítica

La anemia hemolítica es el resultado de un incremento en el ritmo de destrucción de los glóbulos rojos (hemólisis), que no se puede compensar con el aumento en la producción de glóbulos rojos. La destrucción puede deberse a defectos del interior de la célula (defectos intrínsecos de la célula) o a factores externos (causas extrínsecas) (ver cuadro 7). A menudo, otros datos clínicos sobre el paciente brindan algún indicio para efectuar un diagnóstico correcto (por ejemplo, un antecedente familiar de hemoglobinopatía o esferocitosis hereditaria, una transfusión reciente de sangre, paludismo, esplenectomía o un tumor metastásico conocido).

Cuadro 7. Causas comunes de la anemia hemolítica

Causas intrínsecas (congénitas)	Causas extrínsecas (adquiridas)
1. Hemoglobinopatías (S, C, D)	1. Autoinmunidad
2. Talasemia	a. Anticuerpos calientes
3. Deficiencias enzimáticas (es decir, G-6-FD)	b. Anticuerpos fríos
4. Esferocitosis hereditaria	2. Asociadas con drogas (es decir, metildopa y penicilina)
5. Ovalocitosis hemolítica hereditaria	3. Ponoña de serpiente
	4. Parasitismo (paludismo)
	5. Anemia hemolítica microangiopática
	6. Hiperesplenismo
	7. Isoinmunidad

Extendido de sangre

El extendido de sangre periférica se debe examinar para ver si no hay "microesferocitos", glóbulos rojos que parecen pequeños, densos y esféricos (microfotografías 1-48). Cuando estas células constituyen la anomalía fundamental de los glóbulos rojos, el laboratorista debe tener en cuenta dos causas principales: 1) anemia producida por una anemia hemolítica inmunológica y 2) esferocitosis hereditaria. Los microesferocitos también están presentes en ciertas hemoglobinopatías, sobre todo en la Hb C y en el hiperesplenismo, aunque en estos casos sólo aparecen en cantidades pequeñas y se relacionan con otros cambios morfológicos. En contraste con los glóbulos rojos microcíticos e hipocrómicos, estos glóbulos rojos están densamente aglomerados con la hemoglobina y se incrementa la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) (ver p. 78); el volumen corpuscular medio (VCM) suele ser normal y la hemoglobina corpuscular media (HCM) es normal, mientras que en la anemia hipocrómica se presenta una reducción del VCM, HCM y CHCM.

Si los esferocitos se encuentran asociados con otras anomalías de los glóbulos rojos, hay que tener en cuenta otras condiciones; por ejemplo, si se encuentran microesferocitos en presencia de una gran cantidad de células "blanco", es muy probable que se trate de una enfermedad de hemoglobina C y debe efectuarse la electroforesis. Si, por otra parte, se encuentran glóbulos rojos fragmentados (células espinosas, esquistocitos y células yelmo), la causa más probable es una anemia hemolítica microangiopática (ver cuadro 8), una sepsis causada por *Clostridium* o una posible esplenectomía.

Existen otras causas de la anemia hemolítica en que los esferocitos no son una característica; algunos ejemplos son la deficiencia de glucosa-6-fosfato

Cuadro 8. Condiciones asociadas con la anemia hemolítica microangiopática

1. Hipertensión maligna
 2. Eclampsia
 3. Quemaduras graves
 4. Tumor metastásico difuso
 5. Enfermedad renal grave
 6. Púrpura trombocitopénica trombótica
 7. Síndrome urémico hemolítico
 8. Enfermedad grave de la válvula aórtica (anemia hemolítica mecánica)
-

deshidrogenasa (G6FD), hemoglobinopatías que no sean Hb C y talasemia, hemoglobinas inestables, daño químico, drogas, mordeduras de serpiente y paludismo. Para identificarlas, hay que tener en cuenta la prueba de G6FD, la electroforesis de la hemoglobina, la prueba de lisis de la sucrosa, tinciones para detectar cuerpos de inclusión y examen del frotis de sangre en busca de parásitos. El examen de la médula ósea no es muy útil para diferenciar estas anormalidades, ya que presenta prácticamente los mismos resultados en todas, es decir, un notable incremento en la celularidad eritroide y una reducción en la cantidad de grasa. En este grupo de casos, la prueba de antiglobulina (ver a continuación) es negativa.

Prueba de globulina antihumana (Prueba de Coombs)

Esta prueba sirve para identificar la anemia hemolítica inmunológica y debe efectuarse cuando se cree que existe hemólisis (ver p. 93). Si la prueba es negativa en presencia de esferocitos, el laboratorista deberá tener en cuenta la esferocitosis hereditaria como causa probable de la hemólisis. Después hay que examinar los frotis de sangre de los miembros de la familia del paciente para determinar si también ellos tienen microesferocitos, ya que el descubrimiento de esferocitos en los miembros de la familia estaría sugiriendo un diagnóstico de esferocitosis hereditaria. Una prueba positiva de antiglobulina suele también asociarse con la hemólisis provocada por drogas.

Las hemoglobinas anormales

De las hemoglobinas anormales, la Hb S y la Hb C son las que tienen mayor prevalencia, producen la enfermedad más severa en los individuos monocigóticos y, por ende, son las más importantes en algunos países en vías de desarrollo. La frecuencia del gene de la Hb S suele ser muy elevada en la

región de Africa situada al sur del Sahara (5% a 20%) y también se encuentra en otras regiones, por ejemplo, Chipre, Grecia, partes de India, Centroamérica y Medio Oriente. La Hb C es muy común en Africa Occidental, sobre todo al oeste del Río Níger.

Las hemoglobinas anormales producen enfermedades clínicas, principalmente a causa de 1) la anemia hemolítica y 2) la propiedad inherente que tienen de formar cristales de hemoglobina que deforman las células en forma de medialuna (células falciformes) en ciertas condiciones fisiológicas. Estas células son más rígidas que las normales y suelen causar oclusiones vasculares.

En general, un sólo defecto en los genes produce las hemoglobinas anormales; este defecto hace que se sustituya un aminoácido en la parte de la molécula de hemoglobina que corresponde a la globina. Cuando la sustitución se produce en un lugar crítico, es decir, en aquellos lugares que interactúan con el anillo hem o con otras moléculas de hemoglobina de la célula, se desarrolla una enfermedad clínica. Estas sustituciones suministran la base para una prueba de diagnóstico porque cada aminoácido lleva una carga eléctrica total ligeramente diferente y, cuando se le sustituye en la molécula de hemoglobina, cambia su trayectoria de desplazamiento en un campo eléctrico (electroforesis de la Hb)(ver p. 107).

El mejor método de análisis es la electroforesis de la hemoglobina en acetato de celulosa porque brinda la mejor separación de un gran número de hemoglobinas, incluyendo la Hb A₂, que se puede eluir y cuantificar. Como resulta bastante costoso efectuar la electroforesis en acetato de celulosa, a menudo se realiza en su lugar la electroforesis en papel, que es suficiente en la mayoría de los casos. Cuando se sospecha que los pacientes tienen una hemoglobinopatía, la prueba de células falciformes suele ser una prueba de análisis de gran utilidad. Otros estudios, tales como estudios familiares, pueden ser necesarios para dilucidar las combinaciones genéticas de distintas hemoglobinopatías.

Anemia normocítica asociada con un recuento bajo de reticulocitos

Dentro de esta categoría, la anemia es el resultado de la reducción en la proliferación de las células eritroides, causada por diferentes condiciones (ver cuadro 9), que suelen ser secundarias a una enfermedad sistémica. En la práctica, la mayoría de estos pacientes presentan infección, enfermedad renal crónica, otras enfermedades crónicas, toxicidad con drogas o productos químicos o malnutrición. En ocasiones, la anemia hipoproliferativa coexiste con otra causa que dificulta su identificación. Con frecuencia, el laboratorista encontrará que los síntomas clínicos del paciente son más útiles que la

Cuadro 9. Anemia normocítica asociada con un recuento bajo de reticulocitos

1. Enfermedad renal
 2. Infecciones, inflamación, enfermedades malignas
 3. Malnutrición proteínica
 4. Anemia aplástica
 5. Sustitución de la médula
 - a. Tumor
 - b. Leucemia
 - c. Fibrosis
 - d. Infección (es decir, granulomas crónicos)
 6. Toxinas, venenos, radiación, drogas
 7. Trastornos endocrinos (enfermedad de la tiroides)
-

mayoría de las pruebas hematológicas para efectuar el diagnóstico de la anemia.

Extendido de sangre

El extendido de sangre puede presentar anomalías que indiquen o confirmen el diagnóstico correcto. Por ejemplo, los extendidos de pacientes con anemia mieloptísica (anemia producida por la invasión de la médula ósea con células tumorales o por un incremento en el tejido fibrótico, como en el caso de la mielofibrosis, infección con tuberculosis, etc.) presentarán una amplia variedad de cambios en los glóbulos rojos y leucocitos. Los glóbulos rojos presentan variaciones de tamaño (anisocitosis) y de forma (poiquilocitosis), que pueden ser leves o notorias, y a menudo se observan células con forma de lágrima. Con frecuencia se observan cantidades mayores de glóbulos rojos nucleados que las que cabría esperar del número de reticulocitos. El recuento de leucocitos puede ser normal o elevado, y muchas de las formas precoces de la serie de granulocitos, incluyendo blastos, suelen estar presentes. En estas situaciones, está indicada la biopsia de la médula ósea, que a menudo sirve para efectuar el diagnóstico (cuadro 4).

En ocasiones, la morfología de los leucocitos indica la anemia causada por infecciones agudas o crónicas; por ejemplo, el número de leucocitos puede ser elevado y presentar un incremento en la proporción de leucocitos polimorfonucleares (PMN). Es probable que exista una desviación ordenada a las formas juveniles, con una gran cantidad de células en cayado y, a veces, mielocitos. Los PMN maduros suelen presentar los cambios clásicos producidos por la infección, a saber, granulación tóxica, cuerpos de Dohle o, en casos de septicemia severa, vacuolas en el citoplasma (microfotografías

1-24). Los glóbulos rojos suelen ser hipocrómicos, lo cual refleja el bloqueo en la síntesis de la hemoglobina. A fin de diferenciar la deficiencia leve de hierro de la infección crónica, normalmente es necesario medir la cantidad de hierro en el suero o comprobar la condición de las reservas de hierro en la médula ósea por medio de una tinción especial.

En otras condiciones, la morfología del extendido de sangre resulta menos útil.

Médula ósea

La aspiración de la médula ósea suele ser útil en algunas de estas enfermedades, sobre todo en las asociadas con leucemia, anemia mielopóptica, anemia aplásica, mielofibrosis o infección granulomatosa generalizada. Si no se obtiene médula con la primera aspiración, si el material es escaso indicando hipocelularidad o si la información obtenida es insuficiente, se debe tener en cuenta la posibilidad de efectuar una biopsia con aguja (cuadro 10). Sin embargo, ésta constituye una investigación más especializada; por lo general es necesario recurrir a un laboratorio central para el procesamiento del material y la interpretación de los resultados.

Cuadro 10. Indicaciones para efectuar la biopsia de la médula ósea

1. Sospecha de anemia aplásica
 2. Sospecha de mielofibrosis
 3. Sospecha de leucemia aleucémica
 4. Sospecha de tumor metastásico
 5. Sospecha de infección granulomatosa miliar
 6. Sospecha de linfoma maligno
-

CAPITULO 2

Empleo del laboratorio para pruebas o encuestas de salud pública sobre la anemia nutricional

Como se dijo antes, la anemia nutricional constituye un problema mundial, especialmente en los países en vías de desarrollo; se trata de un importante problema de salud pública que interesa a los organismos gubernamentales, tanto a nivel local como internacional. El laboratorio desempeña un papel importante en los métodos empleados por las dependencias de salud pública respecto a la anemia, ya que colabora en las encuestas e identifica las causas prevalentes de la anemia. Asimismo, el laboratorio desempeña un papel esencial cuando el sector de salud pública emprende programas de intervención.

Empleo del laboratorio para efectuar encuestas sobre la prevalencia de la anemia

Es necesario determinar la prevalencia de la anemia en cada población; y la definición de la importancia de la información obtenida dependerá del objetivo de la prueba y de la localización (consultar más abajo sobre el método general para determinar la normalidad). En estas encuestas se debe evaluar con exactitud la Hb (y el Hto) porque la intervención a nivel nacional que se basa en una información deficiente puede resultar un desperdicio. El estudio tiene que incluir un buen control de calidad a fin de obtener determinaciones tan exactas y precisas como sea posible. En general, lo anterior significa emplear el método de la cianohemoglobina para determinar la Hb usando el espectrofotómetro o el fotómetro (ver p. 65) y contar con un laboratorio central que pueda respaldar el trabajo realizado en el campo. La experiencia ha demostrado que la coordinación, el control de calidad y la supervisión global del trabajo de laboratorio son esenciales para que la información generada en el campo sea confiable.

Empleo del laboratorio para determinar la prevalencia de las causas de la anemia

El método para diagnosticar los tipos de anemia puede adoptar dos formas diferentes. La primera consiste en evaluar a los miembros de la población que

se sabe que tienen anemia. Desde el comienzo del estudio, se determina y registra la causa de la anemia. Este método requiere más recursos de laboratorio, pero, a la larga, ahorra tiempo y recursos, sobre todo en aquellos países donde no existe una causa predominante de la anemia.

La segunda consiste en utilizar un ensayo terapéutico; este método suele ofrecer ciertas ventajas, especialmente en aquellos países donde prevalece un tipo particular de anemia. Es posible identificar las causas de la anemia, suministrando complementos de hierro, folatos, vitamina B₁₂, placebos o combinaciones de éstos a grupos de personas de la población que se desea estudiar, para determinar si la hemoglobina aumenta o no. A continuación, las personas que presenten anemia residual pueden ser evaluadas de nuevo para determinar la causa específica de la anemia mediante métodos convencionales. Con esta metodología, es preciso identificar y volver a tomar muestras de los mismos individuos en una segunda encuesta, y el estudio debe asegurar que tales personas hayan ingerido las sustancias prescritas.

Sin duda, la causa prevalente de la anemia en determinadas regiones geográficas debe definir la investigación mínima que se debe efectuar en un paciente con anemia y las instalaciones de laboratorio que se necesitan en este nivel periférico. Las autoridades locales de salud pública encontrarán útil la información obtenida de la encuesta al planificar las necesidades mínimas de los laboratorios periféricos que dan servicio a esa localidad.

Desde el punto de vista del análisis estadístico posterior, la determinación de la prevalencia de las causas de la anemia es una labor relativamente complicada, ya que para que los resultados sean válidos se requiere un muestreo adecuado de una población definida con claridad. En consecuencia, lo más conveniente es que, antes de comenzar el estudio, el investigador colabore en forma estrecha con un epidemiólogo o un experto en estadística para diseñar el estudio.

Valores normales de referencia

La frase “valores normales” refleja el concepto de buena salud, considerado como un estado normal. Se trata de una norma que puede aplicarse a nivel mundial, y se dice que un individuo goza de buena salud cuando satisface todos los criterios normales de la buena salud; las únicas diferencias permitidas son las referentes a edad, sexo y región geográfica (altitud). Los valores de normalidad estadística que se basan en las frecuencias relativas definen los límites superior e inferior de la variación; los valores centrales de este rango se aceptan como medias normales de una población homogénea dada de personas normales. El laboratorio debe contar con escalas adecuadas de valores normales para efectuar comparaciones.

El término “valores de referencia” se refiere a un grupo o población definidos. Puede tratarse de una población normal, como se describió antes, pero también puede referirse a una comunidad de personas que presenta una enfermedad endémica o una condición ambiental en la que es importante poder identificar a los pacientes que quizá presenten otra enfermedad; esto, por supuesto, es esencial para definir la población de referencia.

Para establecer valores de referencia en cualquier grupo de edad y para cada sexo, suele considerarse adecuada una muestra de 40 individuos para cada categoría. El método más sencillo para calcular los valores de referencia, empleando una población seleccionada y en apariencia normal, es:

1. Calcular la media y la desviación estándar (DE) con las fórmulas:

$$\bar{x} \text{ (media)} = \frac{\text{Suma de todos los resultados}}{n} \quad DE = \sqrt{\frac{\text{suma de } (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

donde x = medición individual

\bar{x} = media

n = número de valores

2. A partir de estos datos, calcular el rango $\bar{x} - 3DE$ a $\bar{x} + 3DE$.
3. Eliminar de los datos originales todos los valores que estén fuera de estos límites.
4. Volver a calcular \bar{x} y DE a partir de los valores restantes.
5. El rango normal aceptado es entonces $\bar{x} \pm 2DE$, que incluye el 95% de todos los sujetos normales.

CAPITULO 3

Control de calidad

En el sentido amplio, el control de calidad comprende prácticas adecuadas de laboratorio, recolección y manejo correctos de las muestras, métodos convenientes con reactivos fiables y preparaciones de referencia, mantenimiento apropiado del equipo y un sistema diseñado para verificar la confiabilidad de los resultados obtenidos.

En el trabajo de laboratorio son importantes tanto la exactitud como la precisión, que deben permanecer dentro de límites aceptables. Este debe ser el objetivo de todos los programas de control de calidad. En general, el *control interno de la calidad* consiste en pruebas de los materiales de control y análisis de los datos obtenidos de las muestras de pacientes. Por lo común se trata de un método para controlar la precisión, mientras que el objetivo de los programas externos de evaluación de la calidad suele ser el control de la exactitud (ver pp. 52 y 53).

La exactitud y la precisión no son lo mismo; una prueba puede ser reproducible, es decir, precisa, pero muy inexacta. La diferencia entre exactitud y precisión se presenta en la ilustración de disparos individuales en relación con el centro del blanco (figura 5):



Fig. 5. Explicación de la diferencia entre exactitud y precisión.

Así, la *exactitud* es la medición de la cercanía de un valor estimado respecto al valor verdadero y la *precisión* es el grado de acuerdo que existe entre repetidas mediciones de una muestra. El promedio de los resultados obtenidos de todas las mediciones recibe el nombre de *media*. La dispersión de un grupo de valores alrededor de la media se expresa mediante la *desviación estándar* (ver pp. 47 y 48).

La exactitud sólo se puede comprobar mediante el empleo de materiales de referencia. Participar en un programa externo de control de calidad en varios laboratorios es una buena forma de confirmar la exactitud. La precisión se puede verificar por medio de a) pruebas repetidas de muestras “testigo” preparadas de manera especial y b) la duplicación o repetición de las pruebas de muestras normales de pacientes. También es importante determinar cuándo un procedimiento de prueba comienza a desviarse, es decir, cuándo se produce un cambio gradual en el comportamiento de la prueba y en los resultados (a causa, por ejemplo, del deterioro de los reactivos o de un cambio de los aparatos); esta situación se puede detectar con un diagrama de control (ver p. 50).

Preparaciones de referencia y de calibración

Una *preparación de referencia* es una sustancia caracterizada por un medio químico o físico y a la que se le ha asignado un valor. En ocasiones se le da el nombre de “norma”, y existen preparaciones de referencia nacionales e internacionales. Las preparaciones internacionales de referencia son elaboradas por o en nombre de un organismo internacional (por ejemplo, la Organización Mundial de la Salud o el Comité Internacional para la Normalización en la Hematología). Su objetivo es proporcionar una medida para controlar las preparaciones de referencia y los calibradores nacionales (ver más adelante). Se producen sólo en cantidades limitadas y no deben utilizarse como materiales de trabajo en el laboratorio normal. Se suministran a petición de las autoridades nacionales y, en ocasiones, de algún investigador independiente de un país que no cuenta con un organismo que se ocupe de la creación de normas.

Un *material de referencia* es una sustancia o dispositivo que se basa en una preparación de referencia nacional o internacional, utilizada para asegurar la exactitud de un procedimiento de prueba en la práctica normal.

Un *calibrador* es una sustancia que también se basa en una preparación de referencia, en unas especificaciones o en un material de referencia; se emplea para calibrar un aparato o ajustar una medición a fin de obtener resultados exactos.

Un *testigo* es un material empleado para verificar la precisión de un método (es decir, la capacidad de reproducirlo) en la práctica normal; debe tener un comportamiento semejante al de las muestras de los pacientes con las que se analiza. Su objetivo no es comprobar la exactitud, aunque, por supuesto, un calibrador (si se cuenta con uno) puede utilizarse a veces como material testigo y, viceversa, un testigo se puede usar en ocasiones como calibrador, siempre y cuando posea las características que se describen en estas definiciones.

Empleo de muestras “testigo”

Como es obvio, resulta poco práctico verificar la precisión repitiendo varias veces las pruebas en todas las muestras de pacientes; sólo se deben efectuar pruebas repetidas en muestras “testigo” especiales. Para verificar la precisión, no es necesario conocer el valor real de la muestra “testigo”; *empero, si el valor ha sido determinado de manera confiable (por ejemplo, por un centro de referencia) el material testigo también se puede usar para comprobar la exactitud (ver pp. 45 y 46)*. Si se cuenta con ellos, deben preferirse los testigos con valores altos, bajos y normales.

Dependiendo de la prueba, las muestras “testigo” pueden ser sangre entera anticoagulada, mezcla de glóbulos rojos conservados, plasma o suero. En las diferentes pruebas se describe la preparación de estos materiales.

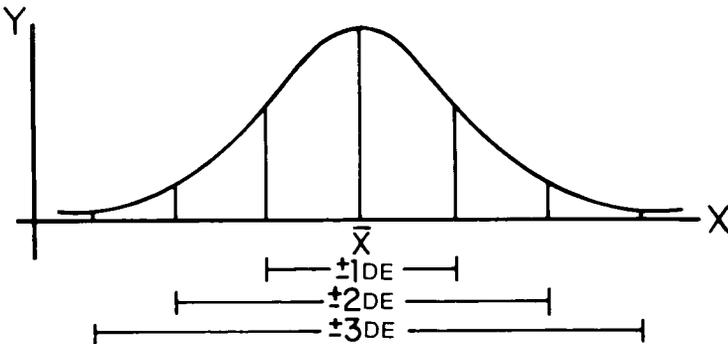
Se recomienda emplear por lo menos una muestra “testigo” para cada lote, aunque éste contenga una sola muestra; si el lote es grande, debe haber un testigo por cada 20 muestras de pacientes.

Como el objetivo de los testigos introducidos en el sistema de la prueba es simular el muestreo aleatorio, se les debe tratar exactamente de la misma manera que las muestras de los pacientes. Los resultados del análisis de las muestras “testigo” se grafican tal como se describe en la página 50.

Desviación estándar

Para comprender la importancia de la desviación estándar (DE) en el contexto del control de calidad, es necesario estar consciente de la forma en que probablemente los resultados de la prueba se encuentren por encima o por debajo de la media. La distribución de estos resultados puede definirse como una curva de Gauss, que presenta el aspecto siguiente (figura 6).

La DE expresa la medición de la dispersión.



Curva de distribución normal (Curva de Gauss)

Fig. 6. Curva de distribución de Gauss

En términos sencillos, la DE es sólo un criterio que utilizamos. El área bajo el centro de la curva, $\pm 1DE$, equivale al 68% de toda el área; $\pm 2DE$ equivale al 95%; $\pm 3DE$ equivale al 99,7%. Si se fijan los límites en $\pm 2DE$ y se efectúan 100 mediciones de hemoglobina en la misma muestra, el 95% de las 100 se encontrará dentro de $\pm 2DE$; lo cual también significa que, por mera probabilidad, cinco de cada 100 determinaciones estarán fuera del rango del 95%. La mayoría de los laboratorios fijan sus límites de control de calidad en $\pm 2DE$.

Cálculo de la desviación estándar

La DE se calcula a partir de la fórmula $DE = \sqrt{\frac{\text{suma de } d^2}{n - 1}}$ donde "d" equivale a la diferencia de los resultados individuales de la media, y "n" equivale al número de mediciones. Este cálculo se obtiene con facilidad utilizando una calculadora con la que se pueda obtener directamente la DE de los resultados de las pruebas. No obstante, también se puede obtener, con un poco más de trabajo, mediante cálculos directos; en el siguiente ejemplo con Hb se presenta el método para hacerlo.

- Efectúe 20 mediciones consecutivas de Hb en una muestra. Cada medición se denomina "x" y el número de mediciones "n".
- Tabule las mediciones en una columna; calcule la media de las mediciones (\bar{x}) y calcule $(x - \bar{x})$ y $(x - \bar{x})^2$ como se indica a continuación:

Prueba	x	(x - \bar{x})	(x - \bar{x}) ²
1	155	+4	16
2	148	-3	9
3	152	+1	1
4	147	-4	16
5	150	-1	1
6	156	+5	25
7	156	+5	25
8	157	+6	36
9	153	+2	4
10	150	-1	1
11	150	-1	1
12	147	-4	16
13	144	-7	49
14	152	+1	1
15	157	+6	36
16	152	+1	1
17	147	-4	16
18	152	+1	1
19	145	-6	36
20	150	-1	1

$$\text{Suma de } x = 3020$$

$$n = 20$$

$$\text{Entonces, } \bar{x} = \frac{3020}{20} = 151$$

$$\text{Suma de } (x - \bar{x})^2 = 292$$

$$\frac{(x - \bar{x})^2}{n - 1} = \frac{292}{19} = 15,36$$

c) Calcule $\sqrt{\frac{(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$. En el ejemplo sería:

$$\sqrt{15,36} = 3,9192, \text{ es decir, } 3,9 \text{ (al punto decimal más cercano)}$$

Entonces, la DE = $\pm 3,9$ ó, para que sea más práctico, ± 4 (g/l)

Coefficiente de variación (CV)

Este coeficiente relaciona la DE con las mediciones reales, de tal manera que sea posible comparar las mediciones de diferentes niveles. El CV (como

porcentaje) se calcula así: $\frac{DE}{media} \times 100$.

Luego, usando el ejemplo dado, $CV = \frac{3,9}{151} \times 100 = 2,58\%$

Preparación de una gráfica de control

Antes de utilizar una muestra “testigo” hay que efectuar una serie de por lo menos 20 mediciones del elemento en cuestión y calcular la media y la DE de los resultados, ya que estas mediciones se emplean para elaborar la gráfica (ver pp. 48 y 49) para el cálculo de la DE. A fin de obtener resultados óptimos, estas mediciones deben hacerse con sumo cuidado y en condiciones tan ideales y constantes como sea posible. En las gráficas de control se traza la media de forma tal que represente la línea base; las líneas que representan + y - 2DE se trazan por encima y por debajo de la línea base (ver figura 7).

A continuación se usa la muestra “testigo” junto con las muestras normales y se grafican. Las siguientes pautas ayudarán a los laboratoristas a decidir si la prueba está fuera de control, es decir, si algo va mal:

- un valor se encuentra totalmente fuera de los límites de control de $\pm 2DE$
- varios valores consecutivos presentan una tendencia ascendente
- varios valores consecutivos presentan una tendencia descendente
- varios valores consecutivos se encuentran en un lado de la media
- dos o más resultados de cada 20 se encuentran en las líneas + ó - 2DE

En la figura 7 se presentan ejemplos para detectar un deterioro en el comportamiento.

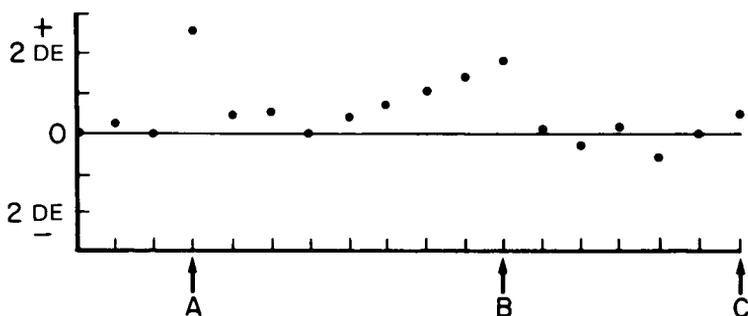


Fig. 7. Gráfica de control de calidad

- A: Valor fuera de $+2DE$; se debió a un error de pipeteado.
 B: Varios valores caen en forma consecutiva en un lado de la media y presentan una tendencia ascendente; se debió al deterioro del diluyente.
 C: Con buen control.

Empleo del método de suma acumulativa

Este método suministra una exposición visual sencilla de los datos obtenidos en la prueba de precisión. En ocasiones, constituye un indicador más sensible para determinar si un sistema se encuentra fuera de control, y resulta de gran utilidad para detectar un cambio constante en el comportamiento causado por una desviación.

La técnica del método de suma acumulativa se emplea de la siguiente manera:

El valor medio de la muestra "testigo" se establece, como se indicó anteriormente, a partir de una serie de 20 mediciones. Cada vez que se mide la muestra, este valor medio se resta del valor observado, y se grafica la diferencia. Si los valores observados son semejantes al valor medio inicial, con sólo diferencias aleatorias, algunas de las diferencias serán positivas y otras negativas, de forma tal que el método de suma acumulativa oscilará alrededor del cero, y la gráfica será más o menos horizontal. Las diferencias constantes en los valores observados resultarán en un cambio en la pendiente de la línea, con diferencias cada vez mayores, que se tornarán significativas conforme lleguen a $2DE$ de la media. La escala empleada para graficar los resultados es de gran importancia: la línea de unidades del eje horizontal (por ejemplo, un día) debe trazarse de manera tal que corresponda a la escala de $2DE$ en el eje vertical, como se ilustra en la figura 8.

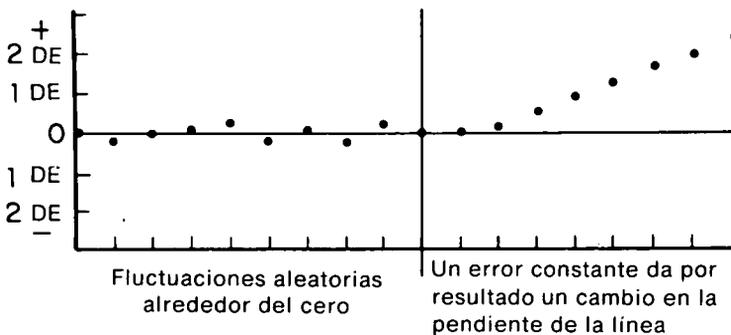


Fig. 8. Método de suma acumulativa para el control de calidad

Empleo de muestras de pacientes

Otra forma de comprobar la precisión del trabajo normal consiste en repetir el examen de muestras seleccionadas de pacientes. De esta manera, cada décima o vigésima muestra se separa para analizarla más adelante el mismo día o al día siguiente. El elemento que se desea medir debe poseer una estabilidad suficiente para tolerar el retraso necesario.

Se calculan las diferencias entre los resultados de las dos pruebas de la misma muestra y se calcula la desviación estándar con la fórmula $DE = \sqrt{\frac{\text{suma de } d^2}{2n}}$, donde d^2 representa la diferencia de las pruebas elevada al cuadrado y "n" es igual al número de pruebas apareadas. Los resultados se pueden graficar de forma semejante a la empleada para las muestras "testigo," en la que la línea base representa al cero.

A fin de que el comportamiento sea aceptable, el 95% de las pruebas efectuadas (es decir, 19 de cada 20) deben tener una desviación de menos de $\pm 2DE$. Con este procedimiento es posible detectar las alteraciones (deterioro) de los aparatos y reactivos, así como la alteración del comportamiento que se haya producido entre las pruebas duplicadas, siempre y cuando se tenga la certeza de que la muestra en sí misma no ha sufrido ningún cambio.

Exactitud

Las pruebas de control que se describieron no sirven para verificar la exactitud. En las pruebas de control sólo es posible comprobar la exactitud si se conoce el valor verdadero del material testigo. También se puede verificar midiendo el material de referencia que posee un valor conocido, determinado con anterioridad en un instituto de referencia (laboratorio de referencia o laboratorio internacional de referencia). Cuando se proporciona este valor conocido, suele incluirse la DE, que es el límite de precisión obtenido en el laboratorio de referencia.

En el laboratorio normal, es necesario medir 20 veces este material para obtener una media estadísticamente válida (con esto se superarán los errores causados por la imprecisión). El resultado medio debe encontrarse dentro del rango suministrado por el laboratorio de referencia; en caso contrario, es necesario buscar la causa, que se estudiará en cada una de las pruebas.

Pruebas de exactitud

La prueba esencial de exactitud se realiza utilizando las preparaciones y materiales de referencia como se describió anteriormente. Otros dos procedimientos que ayudan a asegurar que se mantenga la exactitud son: 1) un

procedimiento para obtener una media diaria de los resultados de los pacientes y 2) un procedimiento de evaluación externa de la calidad.

Media diaria de los resultados de los pacientes

La importancia de una media diaria de los resultados de los pacientes se basa en el hecho de que, para una población determinada de pacientes, la media de todos los valores tiende a permanecer constante. Sin embargo, este método requiere complicados procedimientos estadísticos (sobre todo si la distribución de los resultados es irregular y no sigue el modelo de Gauss) y, en general, sólo se utiliza en laboratorios que cuentan con contadores electrónicos de células y servicio de computación.

Evaluación externa de la calidad

La evaluación externa de la calidad constituye un complemento importante e incluso esencial del sistema interno de control de la calidad. La razón es que, incluso cuando se toman todas las precauciones posibles para lograr precisión y exactitud en el laboratorio, se producirán errores que sólo se pueden demostrar con este método.

El principio es que un centro envía el mismo material a un gran número de laboratorios; todos los laboratorios envían los resultados de regreso al centro donde se analizan. Dicho análisis incluye la media, la DE y una indicación de cuál es el comportamiento aceptable en la comparación con el de otros participantes y, a menudo, con el comportamiento en el centro de referencia. La Organización Mundial de la Salud ofrece a los laboratorios centrales de distintos países la oportunidad de participar en programas semejantes a nivel internacional.

Resultados aceptables (comportamiento adecuado)

No analizaremos el comportamiento adecuado respecto a la exactitud en un programa de evaluación externa de la calidad, ya que del mismo se encarga el laboratorio central, que establece cuáles son los criterios de confiabilidad más apropiados.

El comportamiento aceptable en cuanto a la *precisión* se basa en la distribución de los resultados en pruebas repetidas del mismo material. La DE de las pruebas repetidas no debe, en general, ser mayor de 1/8 del rango normal; por ejemplo:

El rango normal de hemoglobina es de 130-170 g/l; la DE aceptable es de 5 g/l.

El rango normal del hematócrito es de 40%—54%; la DE aceptable es de 2%.

En la práctica, cuando hay anemia, tales niveles de DE tienden a ser proporcionalmente inferiores si se miden con el mismo grado de precisión.

Pruebas cualitativas

El método para asegurar la confiabilidad de las mediciones efectuadas en procedimientos cualitativos, tales como la prueba de células falciformes, en que los resultados se dan como positivo o negativo, consiste en incluir en cada lote de pruebas muestras que se sabe son positivas y negativas.

Control de la morfología

La evaluación morfológica de los frotis de sangre y médula ósea es muy subjetiva y depende también de la adecuada preparación y procesamiento con tinciones de buena calidad. Los supervisores deben comprobar de manera regular la confiabilidad de este procedimiento e intercambiar portaobjetos con otros laboratorios. Siempre que sea posible, el personal con menos experiencia debe mostrar a los supervisores todas las anomalías importantes, tales como glóbulos blancos precoces o que reaccionan, trombocitopenia o cambios importantes en los glóbulos rojos. Las visitas del personal experto de supervisión a laboratorios más pequeños deben incluir el examen de los portaobjetos con preparaciones de sangre. Sostener con regularidad discusiones con los miembros del departamento acerca de las preparaciones de interés especial constituye un excelente medio de estimular el interés e incrementar el conocimiento de la correcta evaluación morfológica de los extendidos de sangre y de los frotis de médula ósea. La evaluación cuidadosa de los extendidos de sangre es de gran utilidad para detectar errores importantes en los índices de glóbulos rojos y en los recuentos de glóbulos blancos y plaquetas, además de suministrar valiosa información clínica.

Calibración, cuidado y mantenimiento del instrumental de laboratorio

Centrifugadora

1. La velocidad de la centrifugadora (revoluciones por minuto—rpm) se debe revisar cada tres o cuatro meses con un tacómetro.
2. El funcionamiento de los cronómetros se debe comprobar cada mes con un reloj o cronógrafo.
3. Las bandas de goma de la tapa de la centrifugadora se tienen que revisar cada mes y cambiar si están desgastadas.

4. Es necesario inspeccionar las escobillas cada seis meses y cambiarlas cuando el contacto con el rotor deja de ser adecuado.

5. Las cabezas de la centrifugadora sólo se deben limpiar con agua y jabón.

6. Al cargar la centrifugadora, es preciso tener cuidado de equilibrar los tubos que se encuentran en la cabeza, sopesándolos en los cubos y agregando el agua necesaria a los cubos (¡no a los tubos!).

Microscopio

Cada 12 meses, una persona capacitada debe limpiar perfectamente el microscopio. Hay que limpiar todos los días los oculares y objetivos, incluyendo la lente para aceite de inmersión, con papel para lentes o con una tela de algodón limpia. No se debe utilizar ningún otro material: se puede usar xilol muy de vez en cuando y nunca hay que emplear alcohol ni otros solventes, sobre todo en los objetivos.

Cuando el microscopio no se está utilizando, hay que cubrirlo para que no se acumule una cantidad excesiva de polvo. En los trópicos se debe guardar, si es posible, en un gabinete calentado con una bombilla eléctrica a fin de evitar que los hongos proliferen en las lentes.

Pipetas

Si bien es cierto que las pipetas adquiridas de fabricantes prestigiados suelen ser confiables, es conveniente verificar todas las pipetas capilares graduadas antes de usarlas por primera vez. El procedimiento que se describe a continuación también se puede aplicar a las pipetas desechables.

Equipo

1. Mercurio
2. Jeringa para tuberculina
3. Manguera de plástico o de hule de paredes gruesas
4. Vaso de precipitados de 50 ml
5. Pesafiltros
6. Balanza

Procedimiento

1. Lavar la pipeta con detergente y agua potable, enjuagar con agua destilada y después con acetona y dejar secar.

2. Colocar el mercurio en el vaso de precipitados. Pesar un pesafiltros y registrar el peso.

3. Conectar la punta de la jeringa a la pipeta con un pedazo pequeño de manguera de hule o de plástico de paredes gruesas.

4. Sumergir la punta de la pipeta en el mercurio; jalar lentamente el émbolo para que la pipeta se llene de mercurio. Al alcanzar la marca de graduación, hay que vaciar el mercurio en el pesafiltros, volver a pesarlo y leer el peso. El peso del mercurio se determina restando el peso del pesafiltros vacío del peso final con el mercurio; la determinación del peso debe efectuarse dos veces.

5. Establecer el volumen del peso del mercurio (en litros), dividiendo el peso (en mg) por un factor de 13,54.

6. Si el volumen difiere en más de 1% del volumen establecido, la pipeta no se debe usar o hay que aplicar un factor apropiado de corrección.

El volumen real de la pipeta (en μl ; por ejemplo, 21 μl) dividido por el volumen indicado por la pipeta (por ejemplo, 20 μl) da el factor de corrección de la pipeta (en el ejemplo, el factor sería $\frac{21}{20} = 1,05$).

Empleo de pipetas capilares graduadas

Sólo se deben utilizar pipetas de buena calidad con una exactitud de 1%; si una pipeta se desportilla hay que desecharla.

Las pipetas se deben lavar por lo menos una vez al día con un detergente biodegradable y con abundante agua potable, enjuagar con agua destilada y colocar en una estufa o en la parte superior de una caja caliente para su secado.

La muestra se coloca justo por encima de la marca y la parte exterior se limpia con un pedazo de papel de seda; el exceso de sangre se elimina de la pipeta tocando ligeramente la punta. La pipeta se coloca con la punta en el fondo del tubo de ensayo que contiene el reactivo y el contenido se expulsa soplando con suavidad en la pipeta. A continuación, la pipeta se retira en parte de la solución y se enjuaga tres veces con reactivo de la capa superior del tubo de ensayo. No se debe dejar que la sangre sobrepase la marca y que después baje hasta la marca, ya que si esto sucede, una parte del exceso de sangre puede adherirse a la pared, enjuagarse con el reactivo y dar valores altos falsos.

Fotómetros

La absorbancia (densidad óptica) o transmitancia de soluciones que tienen o se aproximan a una longitud dada de onda se puede medir en un fotómetro de filtro o en un espectrofotómetro.

Fotómetro de filtro

En el instrumento se inserta un filtro adecuado, que dé una franja de luz bastante estrecha alrededor de la longitud de onda deseada; se anota la lectura

métrica de la muestra, utilizando agua o un reactivo como blanco y se lee la concentración de la muestra en un cuadro o gráfica de calibración preparados con anterioridad (pp. 58-59). Es necesario verificar diariamente la validez de este cuadro o gráfica de calibración efectuando mediciones de soluciones "testigo" o de referencia. Algunos instrumentos fabricados específicamente para la hemoglobimetría están provistos de una escala calibrada directamente en g/dl o g/l. La muestra diluida de sangre se mide utilizando agua o un reactivo como blanco, y el contenido de hemoglobina se lee de forma directa. Es preciso verificar regularmente la calibración de este tipo de instrumentos empleando soluciones de referencia de cianohemoglobina (HiCN).

Espectrofotómetros

Estos instrumentos están provistos de un prisma o una rejilla para obtener una luz monocromática en o alrededor de una longitud de onda determinada. La longitud de onda deseada se obtiene colocando el indicador de la longitud de onda en el valor adecuado.

Este instrumento debe calibrarse de manera regular con preparaciones de referencia de HiCN.

Empleo del instrumento

Existen diversos métodos para usar el instrumento y, por ende, hay que seguir las instrucciones específicas del fabricante.

Estabilidad del instrumento

El instrumento debe encenderse 5-10 minutos antes de usarlo para que pueda estabilizarse, y debe permanecer encendido durante toda la jornada de trabajo. Si el medidor fluctúa en exceso mientras se utiliza el instrumento, quizá sea necesario utilizar un estabilizador de corriente, sobre todo en aquellas zonas en que hay mucha variación en el voltaje de la fuente de energía.

Probetas

Se deben usar probetas iguales (tubos de muestras diseñados para un colorímetro determinado); esto se aplica también a los tipos "desechables" de plástico que pueden volver a utilizarse. Se verifican leyendo el valor de la absorbancia en la escala cuando la misma solución se coloca en forma consecutiva en una serie de probetas limpias y secas. Para el trabajo normal se eligen probetas con las que se obtengan lecturas idénticas. Algunos instrumentos están provistos de una probeta fija y de un dispositivo de succión para vaciarlos; en este caso, no es necesario comparar e igualar las probetas.

Si el instrumento está equipado con probetas redondas, primero hay que hacer girar con lentitud las probetas llenas de una solución de referencia y observar el ligero movimiento de la aguja del medidor. En el punto medio del movimiento de la aguja, las probetas se marcan con un lápiz con punta de diamante de acuerdo con una marca hecha en la caja del reservorio. Las probetas que presentan lecturas idénticas se eligen para el uso normal. Las probetas se deben colocar siempre en la misma posición en el reservorio, usando la marca de la caja como referencia.

Al final de cada jornada, las probetas se deben lavar con detergente y enjuagar muy bien con agua destilada. Hay que tener cuidado de que la superficie no se raye.

Preparación de una gráfica o cuadro de calibración

Es preciso elaborar una gráfica de calibración cada vez que se usa un nuevo fotómetro en el laboratorio y, después, cada seis meses*. El siguiente ejemplo ilustra la preparación de una gráfica de calibración que se emplea en hemoglobinometría, aunque los mismos principios se aplican a otras pruebas.

Para preparar una gráfica de calibración se requiere una serie de cinco probetas o tubos; en estos tubos se pipetea las siguientes cantidades de una *preparación de referencia* de cianohemoglobina (HiCN), usando una pipeta graduada de 10 ml.

- tubo 1: 6 ml, aproximadamente
- tubo 2: 4,5 ml, medidos con exactitud
- tubo 3: 3 ml, medidos con exactitud
- tubo 4: 1,5 ml, medidos con exactitud
- tubo 5: nada

Después de pipetear la solución de referencia, la pipeta debe enjuagarse muy bien con *reactivo* de cianohemoglobina, se desecha el líquido con que se enjuagó y, con la misma pipeta, se agrega reactivo a los cinco tubos de la siguiente forma:

- tubo 1: nada
- tubo 2: 1,5 ml, medidos con exactitud
- tubo 3: 3 ml, medidos con exactitud
- tubo 4: 4,5 ml, medidos con exactitud
- tubo 5: 6 ml, aproximadamente

Se mezcla bien el contenido de cada uno de los tubos.

Las concentraciones de hemoglobina de los cinco tubos serán respectivamente: valor marcado (potencia completa); tres cuartas partes del valor mar-

* Si existe cualquier duda respecto al funcionamiento del instrumento, se debe acortar el período, por ejemplo, a una o dos semanas.

cado; la mitad del valor marcado; una cuarta parte del valor marcado; potencia cero (blanco). Con un filtro de 540 nm, la probeta que sólo contiene reactivo (tubo 5) se coloca en el soporte, y el instrumento se pone en absorbancia cero (100% transmitancia). El contenido de los tubos 1, 2, 3, y 4 se pasa a probetas limpias, secas e iguales.

La parte exterior de las probetas se limpia con cuidado para eliminar la humedad, huellas dactilares o pelusas. Las probetas se colocan de manera sucesiva en el instrumento y se anotan las lecturas.

Si las lecturas corresponden a la absorbancia (A), se grafican en la escala vertical y la concentración de hemoglobina en la escala horizontal de una gráfica en papel milimétrico. Si las lecturas corresponden al porcentaje de transmitancia, es necesario utilizar papel semilogarítmico y graficar la transmitancia en la escala vertical (logarítmica). Los distintos puntos deben formar una línea que atraviese el cero (figura 9).

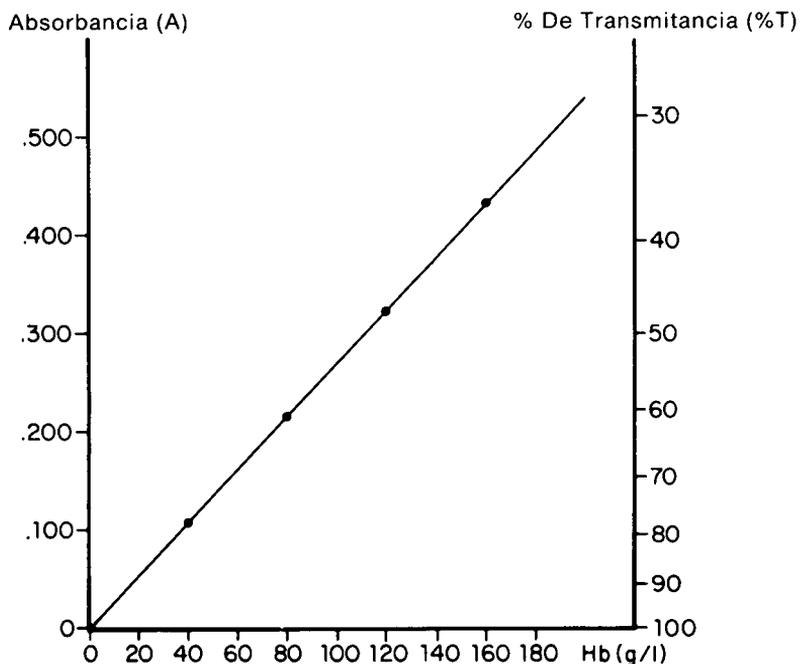


Fig. 9. Gráfica de calibración para mediciones de hemoglobina con un fotómetro. En el lado izquierdo, la escala vertical es aritmética para leer la absorbancia; en el lado derecho, la escala es logarítmica para leer la transmitancia.

Los valores de hemoglobina de las muestras de sangre que se diluyen de manera semejante pueden leerse en la gráfica de calibración o, de preferencia, en un cuadro que se puede elaborar a partir del rango de valores obtenido. Si la línea de la gráfica de calibración no es recta en toda su longitud, sólo se podrá emplear la parte recta para derivar mediciones. Si la línea no es recta en ninguna de sus partes, es necesario que el fabricante revise el instrumento.

Calibración del espectrofotómetro

La escala de absorbancia se calibra empleando un filtro adecuando que tenga una absorción conocida a una longitud de onda determinada o una solución de contenido conocido y extinción molar conocida, por ejemplo, la preparación de referencia de cianohemoglobina del CINH.

Rectitud de la línea

Se puede comprobar graficando la absorbancia en comparación con la concentración, utilizando, como se describió antes, una preparación de referencia de HiCN en una serie de soluciones de concentración conocida.

Cuidado y limpieza de las probetas

Las probetas se deben limpiar periódicamente para evitar que se deterioren cuando se emplean materiales corrosivos. Las celdas se tienen que limpiar de la siguiente manera:

Después de utilizar las probetas con soluciones acuosas, hay que lavar las probetas con agua destilada; si se usaron materiales orgánicos, lavarlas con un solvente orgánico adecuado, después con alcohol y por último con agua destilada; dejar escurrir boca abajo durante toda la noche. Si queda algún depósito, emplear un solvente preparado con partes iguales por volumen de etanol y 3N HCl. Nunca se deben emplear escobillones ni instrumentos que puedan rayar las celdas. No se deben utilizar álcalis, abrasivos ni ácidos fuertes. Hay que evitar tocar la porción de las probetas a través de las cuales pasa la luz.

Sustitución y alineación de las lámparas

La sustitución y alineación de las lámparas debe hacerse de acuerdo con el manual de instrucciones del instrumento. Se estima que la vida útil de una lámpara de tungsteno es de 1 200 horas si se opera a una potencia de 5,4 voltios con una corriente de 4,5 amperios. La vida de la lámpara se reduce en gran medida si se incrementa el voltaje de operación. La falta de encendido o la rápida reducción de la salida de energía indican el final de la vida útil de la lámpara.

Recolección de muestras

Tan pronto como sea posible, después de recolectar la muestra, debe llegar al laboratorio una muestra adecuada para efectuar la prueba, en un recipiente apropiado y con una etiqueta conveniente de identificación. Hay que tener cuidado de asegurar que la muestra no se hemolise durante la recolección o almacenamiento.

Para extraer sangre, el primer paso es identificar al paciente y escribir su nombre y un número de identificación en el recipiente en que se pondrá la sangre. A continuación, es necesario tranquilizar al paciente y aliviar toda ansiedad antes de comenzar. En la medida de lo posible, la sangre se debe extraer en las mismas condiciones, por ejemplo, cuando el paciente esté descansando, en las mañanas y antes de los alimentos.

Sangre venosa

Las agujas y jeringas que se emplean para venipuntura deben estar secas y esterilizadas. La sangre se extrae mejor de una vena antecubital con una jeringa de vidrio o de plástico. El orificio de la aguja no debe ser muy estrecho. Son adecuadas las agujas calibre 19 a 21 y de 25 a 40 ml. En los países donde la hepatitis B o la hepatitis no A y no B representan un problema importante, hay que tomar todas las precauciones posibles para evitar la contaminación.

Lo mejor es que el paciente esté recostado; si el paciente está sentado, el brazo tiene que estar bien apoyado. Hay que revisar y evaluar las venas aplicando un torniquete en la parte superior del brazo, que sólo debe apretarse lo suficiente para ocluir el retorno venoso. Limpie el brazo con alcohol al 70% y deje secar; fije la vena en la posición correcta, comprimiendo y empujando con el pulgar el tejido blando que se encuentre justo debajo del punto en que se piensa efectuar la punción. Introduzca la aguja en la vena y, si es posible, suelte el torniquete de inmediato; retire el émbolo de la jeringa poco a poco y deje que la sangre llene la jeringa sin aplicar presión negativa. Una vez que se ha obtenido la cantidad necesaria de sangre, retire la aguja, presione el sitio de la punción con una gasa esterilizada y levante el brazo para evitar que siga sangrando.

Retire la aguja de la jeringa y pase con cuidado la sangre al recipiente etiquetado. Si se emplea anticoagulante, mezcle bien y de inmediato la sangre con el anticoagulante, pero hágalo con suavidad para evitar que se forme espuma y que se dañen las células.

Limpieza de agujas y jeringas

Después de usar la jeringa y la aguja, lávelas bien con agua potable para eliminar todos los restos de sangre; si se van a utilizar de nuevo, remójelas

toda la noche en un detergente biodegradable (por ejemplo, Decon 90), enjuáguelas bien en agua potable corriente, sumérlas en agua destilada (o desmineralizada), cambiando dos veces el agua, y séquelas en una estufa a 60°C. Coloque la jeringa (con el émbolo y el cilindro separados) en un tambor grande de cristal o metal y tape el recipiente con algodón hidrófilo no absorbente. Coloque las agujas en tubos de ensayo pequeños, provistos de una almohadilla de algodón no absorbente en el fondo para proteger la punta de la aguja, y tape el extremo abierto. Esterilice en una estufa de aire caliente a 180°C durante 30 minutos o en un autoclave a 121°C y 20 libras por pulgada cuadrada de presión durante 20 minutos. (Si es posible, utilice agujas desechables; si las agujas se vuelven a usar, revíselas cada vez que vaya a utilizarlas para asegurarse de que la aguja no se haya doblado; si está doblada deseche la aguja).

Sangre capilar

La sangre capilar se obtiene haciendo una punción en la piel con una lanceta. En niños y adultos, el mejor sitio es la yema del dedo o el lóbulo de la oreja; en infantes, se prefiere la parte posterior del tobillo. Se debe utilizar una lanceta esterilizada y seca; las lancetas desechables evitan la transmisión de los virus de la hepatitis; si se emplean lancetas no desechables, hay que calentarlas al rojo en una llama y dejar que se enfríen antes de usarlas para evitar la transmisión de una infección.

La punción debe ser profunda para permitir que la sangre fluya libremente, ya que el flujo libre de sangre es esencial y sólo se permite apretar con mucha suavidad; en condiciones ideales, deben salir lenta pero espontáneamente, grandes gotas de sangre. Si la piel está fría y cianótica, los resultados no son fiables; es posible que la piel tenga que ser bañada en agua caliente o frotada con fuerza antes de hacer la punción. Hay que limpiar con una gasa la primera gota de sangre que salga, ya que contiene líquido de los tejidos.

Anticoagulantes

EDTA

Las sales de sodio o potasio del ácido etilendiaminotetracético (EDTA) son poderosos anticoagulantes y son los que suelen elegirse para el trabajo hematológico normal. La concentración recomendada para la sal dipotásica es de 1,5 mg/ml de sangre. El exceso de EDTA afecta los glóbulos rojos y los leucocitos, y produce encogimientos y cambios degenerativos. Si se emplean más de 2 mg de EDTA por ml, puede producirse una disminución importante

en el hematócrito y un incremento en la concentración de hemoglobina corpuscular media. En consecuencia, hay que agregar la cantidad correcta de sangre al anticoagulante. La sangre y el anticoagulante se deben mezclar bien, invirtiendo el recipiente varias veces.

Heparina

La heparina no afecta el tamaño de los eritrocitos y, en comparación con el EDTA, es menos probable que cause hemólisis. Puede usarse a una concentración de 15-20 unidades internacionales por mililitro de sangre. Sin embargo, la sangre heparinizada no debe utilizarse para preparar extendidos de sangre porque colorea el fondo de azul claro, ni para recuentos de leucocitos porque tiende a hacer que los leucocitos se junten.

Almacenamiento y transporte de muestras de sangre

Los extendidos preparados con sangre anticoagulada (EDTA) que ha permanecido no más de una hora a temperatura ambiente, presentan pocos cambios en comparación con los extendidos preparados inmediatamente después de extraer la sangre. A las tres horas, los cambios son discernibles, y a las seis u ocho horas, sorprendentes. Los leucocitos presentan vacuolas y cambios nucleares degenerativos. La morfología de los glóbulos rojos no se ve muy afectada si la sangre permanece hasta seis horas a temperatura ambiente, pero después de seis horas comienza la crenación. Todos estos cambios se producen con mayor rapidez si la temperatura ambiente es más alta, y se retrasan si la sangre se conserva a 4°C. También en otras pruebas se encuentran alteraciones, por lo que aumenta el Hto, disminuye la velocidad de sedimentación y se reducen los recuentos de glóbulos blancos y plaquetas. El recuento de reticulocitos comienza a disminuir a partir de las seis horas y los glóbulos rojos nucleados desaparecen de la muestra de sangre en uno o dos días.

Como estos cambios se producen con mayor lentitud a temperaturas más bajas, en la mayor parte de las pruebas es posible dejar la sangre a 4°C durante toda la noche, aunque es mejor efectuar el recuento de leucocitos y plaquetas en las dos horas siguientes a la extracción de la sangre. La hemoglobina permanece inalterada durante varios días si la muestra de sangre no está contaminada. Si la sangre se almacena a 4°C, es necesario dejar que se caliente a temperatura ambiente y mezclarla bien antes de efectuar las pruebas.

Si las muestras se empacan para el transporte, hay que tomar las precauciones necesarias para evitar que el recipiente se dañe durante el trayecto y

debe tener adecuadas envolturas protectoras para impedir que el contenido se derrame en caso de que el recipiente se rompa o tenga una fuga. Para el transporte en el interior del hospital, suele bastar con colocar las muestras en bolsas de plástico selladas y éstas en cajas con hielo. En caso de que sean transportadas a grandes distancias o enviadas por correo, hay que envolverlas y protegerlas mejor; los recipientes de sangre no deben escurrir durante el trayecto. Si es posible, se debe emplear algún medio para conservar la sangre a baja temperatura durante el recorrido, aunque no se debe congelar la muestra. La caja exterior que contiene la muestra de sangre debe ser capaz de soportar una presión considerable del exterior sin distorsionarse y, si el recipiente interior se rompe, la caja exterior debe evitar que el contenido se escurra al exterior.

En países donde prevalecen la hepatitis B o la hepatitis no A y no B, hay que tomar todas las precauciones posibles para evitar la contaminación.

CAPITULO 4

Métodos de diagnóstico

Medición de la hemoglobina

Método de la cianohemoglobina

Principio

Se recomienda el método de la cianohemoglobina (HiCN) con una solución de referencia de cianohemoglobina según la definición del Comité Internacional para la Normalización en la Hematología (CINH). Con un reactivo apropiado, los derivados de la hemoglobina que suelen estar presentes en la sangre pueden convertirse por completo en cianohemoglobina.

Equipo

1. Espectrofotómetro o fotómetro de filtro para 540 nm
2. Tubos de ensayo de 12 × 100 mm
3. Probetas
4. Pipetas de 20 µl
5. Pipetas volumétricas de 5 ml

Reactivo

1. Reactivo de cianohemoglobina

K ₃ Fe (CN) ₆	200 mg
KCN	50 mg
KH ₂ PO ₄	140 mg
Sterox (SE)*	0,5 mg

Completar un volumen de un litro con H₂O destilada; el pH debe ser de 7,0 a 7,4 verificado con un medidor de pH†.

* Sterox SE es un detergente no iónico; algunas opciones son Triton X-100 (1 ml/l), Nonic 218 (1 ml/l), Nonidet/40 (1ml/l).

† Si no se cuenta con un medidor de pH, se pueden utilizar papel indicador o un método comparador.

Al medir a 540 nm usando agua como blanco, la lectura del blanco debe ser cero. Si se almacena en una botella bien tapada de vidrio resistente al calor de color ámbar a temperatura ambiente, el reactivo se conserva durante varios meses.

Preparación de referencia

Los proveedores comerciales pueden suministrar una solución de referencia de cianohemoglobina que cumpla las especificaciones del CINH, aunque también se puede preparar en un laboratorio central. Es necesario verificar este tipo de preparaciones para asegurar su estabilidad y comportamiento en comparación con la Preparación Internacional de Referencia. Con este fin, la OMS o la Secretaría del CINH proporcionarán unas cuantas ampollas a solicitud de los interesados.

Si se conserva en un lugar oscuro a una temperatura de 4°C a 8°C, la preparación de referencia permanecerá estable durante varios años, siempre y cuando no esté contaminada. Para evitar la contaminación es necesario guardar pequeños volúmenes del material en recipientes individuales; una vez que se abre un recipiente, hay que desechar la solución que no se haya utilizado al final del día.

Muestra

Muestra de sangre venosa con EDTA o sangre capilar.

Procedimiento

1. Encender el fotómetro y dejarlo calentar durante 5–10 minutos antes de usarlo.
2. Usando sangre capilar o una muestra bien mezclada de la sangre con EDTA, pipetear 20 μ l de sangre en 5 ml de reactivo.
3. Mezclar bien y dejar reposar por lo menos durante tres minutos.
4. Transferir a la probeta del fotómetro.
5. Leer la absorbancia o transmitancia (ver p. 59) a 540 nm en comparación con un blanco de reactivo.
6. Convertir la absorbancia o la transmitancia a gramos por litro (g/l), empleando la fórmula que se presenta más adelante o un cuadro o gráfica de calibración elaborados con anterioridad.

Preparación de una gráfica de calibración

En caso de que se someta a prueba una gran cantidad de muestras de sangre (por ejemplo, en un laboratorio normal), es conveniente leer los resultados en una gráfica de calibración que relacione tanto la absorbancia, como lecturas

de transmitancia del fotómetro, con la concentración de hemoglobina en g/l. En la página 58 se describe el método para elaborar la gráfica.

En la medición de hemoglobina, la gráfica de calibración sólo se puede emplear con el instrumento en el que se hubiese obtenido el valor. Es necesario verificarla todos los días midiendo una muestra de la preparación de referencia y de la preparación "testigo" y leyendo en la gráfica su contenido de hemoglobina.

Cálculo de la Hb

$$\text{Hb (g/l)} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra de la prueba}}{\text{Absorbancia de la norma}} \times \text{conc. de la norma}$$

$$(\text{HiCN, mg/l}) \times \frac{\text{factor de dilución}}{1000}$$

Control de calidad

1. Muestra "testigo"

Seleccionar un donante adecuado que tenga HBsAg negativa o, por lo menos, que no tenga antecedentes de ictericia; extraer al donante de 200 a 400 ml de sangre entera y colocarla en una bolsa que contenga de 40 a 80 ml de citrato fosfato dextrosa (CFD) o conservador de ácido-citrato-dextrosa (ACD)*. Mientras se extrae la sangre hay que agitar bien la bolsa del donante para evitar que se coagule. Agregar 300 mg de penicilina sódica G y 500 mg de estreptomina. Sin dejar de mezclar, colocar cantidades iguales de 5 ml en pequeñas botellas o tubos y taparlos. Tomar muestras al azar de 10 botellas del lote, determinar la Hb con tanto cuidado como sea posible y preparar una gráfica de control (ver p. 50). Si la variación (CV) de este lote de prueba es de menos de 2%, se considera que el lote es satisfactorio para emplearlo como testigo. Es necesario almacenar las botellas a 4°C; el material permanecerá estable (si no está contaminado) durante 6–8 semanas y, aunque esté hemolizado, servirá para la determinación de la Hb.

Se deben usar testigos todos los días; los resultados deben encontrarse dentro de los límites establecidos (ver p. 50) y deben ser registrados.

* Las fórmulas de los anticoagulantes son:

	Fórmula A ACD	CFD
Dextrosa (anhidro)	25,0 g	23,5 g
Citrato trisódico (2H ₂ O)	22,0 g	26,3 g
Acido cítrico (H ₂ O)	8,0 g	3,27 g
Fosfato dihidrato de sodio (anhidro)		2,51 g
Agua destilada (Cuanto baste para completar un litro)		

Si los testigos no se encuentran dentro de los límites correctos, hay que determinar la causa y efectuar las correcciones necesarias antes de entregar los resultados de los pacientes.

2. Mediciones por duplicado de muestras de pacientes

Si es posible, hay que efectuar dos pruebas en cada muestra; los resultados no deben diferir en más de ± 2 g/l.

Si no se efectúan dos pruebas en todas las muestras, por lo menos hay que repetir la prueba de cada vigésima muestra y el comportamiento se tiene que verificar mediante el cálculo estadístico de la DE, como se describe en las pp. 48 y 49.

3. Material de referencia

Es necesario verificar el fotómetro todos los días con una preparación de referencia de cianohemoglobina y se debe obtener un resultado con un margen de 2 g/l del valor establecido. Si es preciso, hay que volver a calibrar el instrumento y elaborar una nueva gráfica de calibración.

Fuentes de error

1. Errores causados por una toma inadecuada de muestras. La estasis prolongada que resulta de dejar un torniquete en el brazo por más de un minuto suele producir una falsa concentración alta de hemoglobina en una muestra de sangre venosa. Si se emplea sangre capilar, la presión o el apretamiento excesivos producen un flujo de líquido intersticial que diluye la muestra de sangre.

2. Mezcla incorrecta de la muestra. Hay que invertir el tubo repetidas veces o, preferiblemente, emplear un aparato giratorio mecánico.

3. Errores de pipeteado o dilución.

4. Coagulación de la muestra.

5. Sangre lipémica.

6. Gran cantidad de glóbulos blancos ($50,0 \times 10^9/l$).

7. Calibración incorrecta del instrumento.

8. Reactivo dejado en un lugar expuesto a la luz.

Método de la oxihemoglobina

Principio

Es el método más sencillo y rápido de todos los que hacen uso de un fotómetro, aunque tiene la desventaja de que no se cuenta con una solución de

referencia estable de oxihemoglobina. Por otra parte, no mide otros derivados de la hemoglobina tales como la carboxihemoglobina y la metahemoglobina.

Equipo

El mismo que en el caso de la medición con cianohemoglobina.

Reactivo

1. NH_4OH 0,4 ml amoníaco/l.

Procedimiento

1. Encender el fotómetro y dejarlo calentar durante 5–10 minutos antes de usarlo.
2. Usando sangre capilar o una muestra bien mezclada de sangre con EDTA, pipetear 20 μl de sangre en 5 ml de reactivo.
3. Mezclar invirtiendo el tubo varias veces.
4. Transferir a la probeta del fotómetro.
5. Leer la absorbancia o la transmitancia a 540 nm en comparación con un blanco de reactivo.
6. Convertir la absorbancia o la transmitancia a gramos/litro (g/l), efectuando una comparación con una norma que se evalúa al mismo tiempo o utilizando un cuadro o gráfica de calibración preparados con anterioridad.

Norma

La norma consiste en sangre entera con EDTA o en una muestra “testigo” (ver. p. 47). Primero hay que determinar su valor de hemoglobina con el método de la cianohemoglobina (ver p. 65). Se puede elaborar una gráfica de calibración como se indica en las pp. 58 y 59, usando una dilución de 1:250 de la muestra de sangre (que represente potencia completa) y nuevas diluciones de la mezcla a $\frac{3}{4}$, $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{4}$ como se describió.

Las lecturas se grafican en papel milimétrico; los valores de hemoglobina de las muestras de sangre que se diluyen de manera similar se pueden leer en la gráfica. Es conveniente verificar todos los días una nueva muestra de sangre fresca con el método de la cianohemoglobina y emplear esta muestra como norma secundaria a lo largo del día.

Cálculos directos:

$$\text{Hemoglobina (g/l)} = \frac{\text{absorbancia de la muestra de la prueba}}{\text{absorbancia de la norma}} \times \text{concentración de la norma (g/l)} \times \text{factor de dilución}$$

Fuentes de error

1. Los mismos errores que con HiCN (ver p. 68).
2. Debilitamiento rápido de la solución de HbO₂; es necesario efectuar la medición en un plazo de 6–8 horas.
3. Incapacidad de medir derivados de la hemoglobina que no sean la HbO₂.
4. No contar con una norma estable.

Se recomienda que el valor de hemoglobina de la norma de oxihemoglobina se obtenga con el método de la cianohemoglobina. Sin embargo, si no se dispone de esta última, el valor de hemoglobina de la oxihemoglobina se puede calcular de la siguiente manera:

Diluir la sangre 1:250 en el reactivo de amoníaco, y leer la absorbancia en un espectrofotómetro a 541 nm y a 560 nm en comparación con un blanco de reactivo.

Calcular la concentración de hemoglobina (g/l):

$$1) \text{ a } 541 \text{ nm} = A \times 0,0018 \times 250 \times 10^3$$

$$2) \text{ a } 560 \text{ nm} = A \times 0,00193 \times 250 \times 10^3$$

Concentración de Hb = media de 1) y 2)

Este método sólo es válido si la relación A^{541}/A^{560} se encuentra en el rango de 1,57 a 1,72. Si no es así, es *esencial* efectuar una verificación con la preparación de referencia de HiCN.

Métodos de análisis

No se dispone de un método de análisis sencillo, económico y confiable. El método de Tallquist es el más sencillo y económico de los métodos existentes. En este método se compara directamente el color producido por una gota de sangre sin diluir en un pedazo de papel absorbente, con un conjunto de colores que se supone representan los valores de hemoglobina en concentraciones cada vez mayores; pero el margen de error es del 20% al 50%, razón por la cual no se debe emplear este método.

Técnica de Sahli

El método de Sahli es relativamente poco costoso, pero es lento y difícil de llevar a cabo en forma confiable. Es mucho menos confiable que el método de la cianohemoglobina y tiene un margen de error del 15% al 25% o más. En consecuencia, no se lo recomienda, aunque en ciertas circunstancias tal vez sea el único método disponible y, por ende, se describirá.

Principio

La sangre se lisa en ácido clorhídrico diluido, que convierte la Hb en hematina ácida. A continuación, la solución se diluye hasta que su color sea

igual al de una norma de cristal coloreado; la concentración de Hb se lee directamente (como g/l) en una escala marcada en el tubo. La conversión de la Hb en hematina ácida es un proceso lento, que alcanza su culminación al término de una hora; después, el color comienza a desaparecer.

Equipo

1. hemoglobínómetro de Sahli con tubo graduado
2. Pipeta de 20- μ l

Reactivos

1. 0,1N HCl
2. Agua destilada

Procedimiento

1. Verter un pequeño volumen de 0,1N HCl en el tubo de Sahli, hasta alcanzar la marca de graduación de "20".
2. Usando una muestra bien mezclada de sangre venosa o sangre capilar, pipetear 20 μ l en el HCl y enjuagar la pipeta con la solución diluida de sangre.
3. Dejar reposar durante dos minutos.

La conversión máxima requiere cerca de 60 minutos, pero en la práctica se puede esperar menos tiempo; empero, es necesario que se espere el mismo tiempo en todas las pruebas.

4. Diluir la mezcla del tubo de Sahli con agua destilada hasta que presente la misma intensidad de color que la norma.
5. Leer la concentración de Hb directamente en la escala marcada en el tubo, usando el menisco de la solución como nivel para efectuar la lectura.

Testigos

1. A fin de verificar la exactitud de la norma de Sahli, es necesario medir una serie de muestras de sangre que cubran un rango de concentraciones de Hb (por ejemplo, 50 a 150 g/l); primero con el método de la cianohemoglobina para obtener una medición exacta de su concentración de Hb y después con el método de Sahli. Si la diferencia entre los dos métodos es de más del 10%, hay que determinar si la norma de Sahli no está bien calibrada y, si es necesario, establecer un factor de corrección.

Fuentes de error

1. Error de pipeteado, incluyendo el empleo de pipetas desportilladas, sucias o no calibradas.
2. Alguna falla en la norma de Sahli; quizá sea preciso volver a calibrarla. Debe conservarse en la oscuridad mientras no se utilice.

3. Conversión inadecuada de la Hb; hay que esperar el tiempo suficiente para que se produzca la conversión, ya que, si ésta no se realiza, puede tenerse un margen de error del 40% al 60%.
4. Retraso excesivo antes de diluir y hacer la lectura.
5. Dilución excesiva.
- 6 Variación de la fuente de luz al efectuar la lectura visual.
7. Presencia de sustancias no hemoglobínicas (proteínas, lípidos) en el plasma, que pueden afectar el color de la hematina ácida.

Método del hemoglobínometro de Spencer

Un método conveniente, aunque relativamente costoso, para uso en el campo se lleva a cabo con el hemoglobínometro de Spencer, distribuido por la American Optical Scientific Instrument Division, el cual se basa en la medición de la HbO₂. Con este instrumento se compara la absorción de la luz por parte de la oxihemoglobina en una capa de sangre entera hemolizada que tiene una profundidad definida con exactitud, con la absorción de un pedazo de vidrio normalizado. El instrumento emplea luz de un color que sólo absorbe la oxihemoglobina. La transmitancia característica del vidrio normalizado es semejante a la de la oxihemoglobina.

El instrumento funciona con baterías, y los colores se comparan visualmente. Su principal ventaja es la conveniencia porque no se requiere una muestra diluida de sangre. No obstante, es preciso poseer la habilidad técnica adecuada para asegurar que la capa de sangre en la cámara sea correcta, y pueden producirse errores graves si la cámara no se limpia muy bien después de examinar cada muestra o si algunos coágulos de sangre hacen que la hemoglobina no se distribuya de manera uniforme en la capa.

Hematócrito

Micrométodo

Principio

El hematócrito (Hto) es el volumen de eritrocitos, expresado como una fracción del volumen de sangre entera de una muestra. Los dos métodos empleados para determinar el Hto por centrifugación son el micrométodo y el macrométodo. En ambos métodos se centrifuga una columna de sangre en un tubo de ancho constante, y cerrado en uno de sus extremos. En muchos laboratorios se ha llegado a la conclusión de que el micrométodo es más conveniente y se ha adoptado como método normal.

Equipo

1. Centrifugadora de microhematócrito o centrifugadora de mesa con cabeza de microhematócrito. Debe ser capaz de suministrar una fuerza de por lo menos 10 000 g durante 5 minutos.
2. Tubos capilares—tubos desechables de 7,5 cm de longitud con un ancho uniforme de 1 mm. Deben ser de vidrio con bajo punto de fusión y las paredes de los tubos deben tener de 0,2 a 0,25 mm de espesor. Existen dos tipos:
 - a. Tubos que no contienen anticoagulante y se deben utilizar con sangre anticoagulada.
 - b. Tubos que contienen 2 UI de heparina en forma de película seca y que deben emplearse con sangre capilar obtenida directamente de una punción en la piel.
3. Arcilla plástica para sellar los tubos o gas para sellar los tubos con calor.
4. Lector de hematócrito (por lo común, la centrifugadora está provista de una escala diseñada especialmente para dar lecturas de hematócrito).

Muestra

Sangre venosa con EDTA sódico o potásico o sangre capilar tomada directamente en tubos capilares cubiertos con una película de heparina.

Procedimiento

1. El tubo de microhematócrito se llena mediante acción capilar, ya sea por una punción que hace que la sangre fluya libremente o por sangre venosa bien mezclada. Los tubos capilares deben estar llenos por lo menos en dos terceras partes, pero no más de tres cuartas partes.
2. Sellar el extremo seco del tubo de sangre con el sellador de arcilla o con un sello de calor en una llama de gas; evitar que la sangre quede muy cerca de la llama.
3. Colocar los tubos llenos en las ranuras radiales de la cabeza de microhematócrito de la centrifugadora con el extremo sellado en el borde exterior.
4. Centrifugar durante 5 minutos. Si el Hto es de más de 0,50, centrifugar durante otros 5 minutos a fin de reducir al mínimo el atrapamiento de plasma. Verificar si no hay fugas o escurrimientos en el fondo del tubo.
5. Con un lector de hematócrito, alinear la base de la sangre de la columna con el cero y la parte inferior del menisco del plasma con el 100 (figura 10). La columna de glóbulos rojos se extiende desde la base hasta la capa amarillo blancuzca de leucocitos, pero no la incluye. El valor del Hto se toma directamente del lector. Si no se cuenta con un lector de hematócrito, se

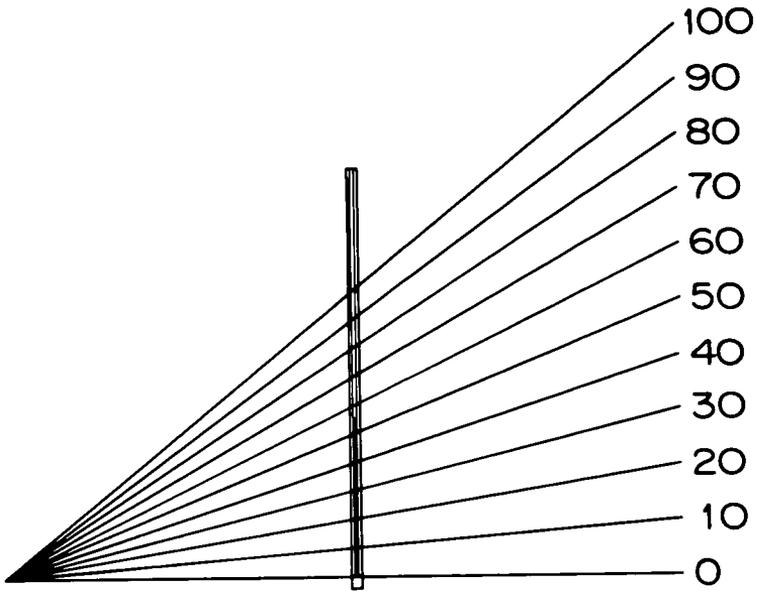


Fig. 10. Tubo de microhematócrito y métodos para la lectura del hematócrito.

puede hacer la medición colocando el tubo sobre un papel milimétrico. El Hto se calcula de la siguiente manera:

$$\frac{\text{No. de líneas trazadas en la longitud de la columna de glóbulos rojos}}{\text{No. de líneas trazadas en toda la columna desde base hasta parte superior del plasma}}$$

Control de calidad

1. Es preciso examinar las muestras dos veces y los resultados deben concordar con un margen de 0,01. Las dos pruebas con sangre con EDTA se deben efectuar con un intervalo de pocas horas.

2. Como material testigo se extraen 200–400 ml de sangre y se distribuyen en volúmenes de 5 ml, como se describe en la p. 67. Se determina el Hto con tanto cuidado como sea posible por medio de pruebas repetidas consecutivas,

y se prepara una gráfica de control (ver p. 50). La DE de las pruebas repetidas debe ser de 0,05. Hay que almacenar el lote a 4°C; permanecerá estable durante tres o cuatro semanas. Si hay hemólisis visible, la sangre no se podrá utilizar para determinar el Hto (aunque sí para determinar la hemoglobina). Todos los días se saca una botella del refrigerador, se deja afuera hasta que alcance la temperatura ambiente y se mezcla bien en una mezcladora mecánica, si se cuenta con una, o a mano. El Hto se determina a intervalos (por ejemplo, después de cada 20 muestras de pacientes) y los resultados se registran en la gráfica de control. Los resultados deben encontrarse dentro de los límites establecidos (ver p. 50). El almacenamiento produce un ligero incremento en el Hto, pero se puede ignorar para fines prácticos.

Fuentes de error

1. Si la sangre se obtiene de una punción en el dedo, es preciso limpiar la primera gota, ya que ésta suele contener líquido intersticial; se emplean las gotas siguientes. La presión o apretamiento excesivos hacen que salga líquido intersticial, que tiende a diluir la muestra y a acelerar la coagulación. La estasis prolongada causada por la constricción con un torniquete durante un minuto o más puede producir un Hto falsamente alto.

2. El EDTA tiene que estar en una concentración de 1,5 mg/ml de sangre. Si el volumen de sangre en el recipiente de la muestra no es adecuado, tal vez se agregue demasiado EDTA y el exceso de éste hará que el Hto sea falsamente bajo a causa del encogimiento de los glóbulos rojos.

3. El almacenamiento de la muestra durante más de 6–8 horas da por resultado un falso incremento en el Hto.

4. Mezcla inadecuada de la sangre antes del muestreo.

5. La sangre tiene que estar bien oxigenada; si no, el Hto será falsamente bajo.

7. En climas cálidos, la heparina de los tubos capilares puede deteriorarse, a menos que los tubos se conserven en un lugar frío.

8. Una centrifugación de corta duración y baja velocidad no produce una aglomeración tan completa como se requiere.

9. Al leer los tubos, deben excluirse los leucocitos y las plaquetas. No obstante, esto suele ser difícil cuando las capas no están bien definidas; además, es preciso evitar los errores de la lectura causados por el paralaje.

10. Los leucocitos, plaquetas y, sobre todo, el plasma atrapado suelen causar errores. El plasma atrapado aumenta en pacientes con policitemia y en otras condiciones, tales como deficiencia de hierro, anemia de células falciformes y esferocitosis hereditaria.

11. Si la centrifugadora se usa constantemente y durante mucho tiempo, sobre todo a alta temperatura ambiente, el calor producido por la centrifugadora puede hacer que la muestra se lise.

12. Precipitaciones (aglutinación de glóbulos rojos, lisis o daño) causadas por el calentamiento de la sangre mientras se sellan los tubos capilares.

13. Evaporación del plasma durante la centrifugación o cuando se deja por un tiempo antes de efectuar la lectura.

14. Escurrimiento inadvertido de los tubos capilares.

Macrométodo

Principio

La sangre se centrifuga durante 30 minutos a 2 000–2 300 g en tubos de Wintrobe. El diámetro interno de estos tubos es de 3 mm aproximadamente, y su longitud de alrededor de 110 mm. Están calibrados a intervalos de 1 mm hasta los 100 mm y tienen capacidad para 1 ml de sangre aproximadamente. Este método ofrece algunas ventajas respecto al método del microhematócrito y no requiere la centrifugadora especial para microhematócrito ni la cabeza de la centrifugadora.

Equipo

1. Tubos de Wintrobe
2. Pipetas de Pasteur con vástagos de 15 cm
3. Centrifugadora capaz de producir una fuerza de 2 000–2 300 g (es decir, una velocidad de unas 3 500 rpm con un radio interno de 15 cm)

Procedimiento

1. Mezclar bien una muestra de sangre venosa con EDTA.
2. Tomar una pequeña cantidad con una pipeta de Pasteur y llenar un tubo de Wintrobe desde el fondo, teniendo cuidado de que no queden burbujas de aire. Llenar el tubo exactamente hasta la marca del 100.
3. Centrifugar durante 30 minutos a aproximadamente 2 300 g.
4. En cuanto la centrifugadora se detenga, retirar el tubo y leer la altura de la columna de glóbulos rojos, excluyendo las capas gris rojiza y blanca de los leucocitos y plaquetas (figura 11). Expresar el Hto como una fracción del volumen total de sangre.
5. Si el Hto es de más de 0,50, centrifugar el tubo durante otros 30 minutos.

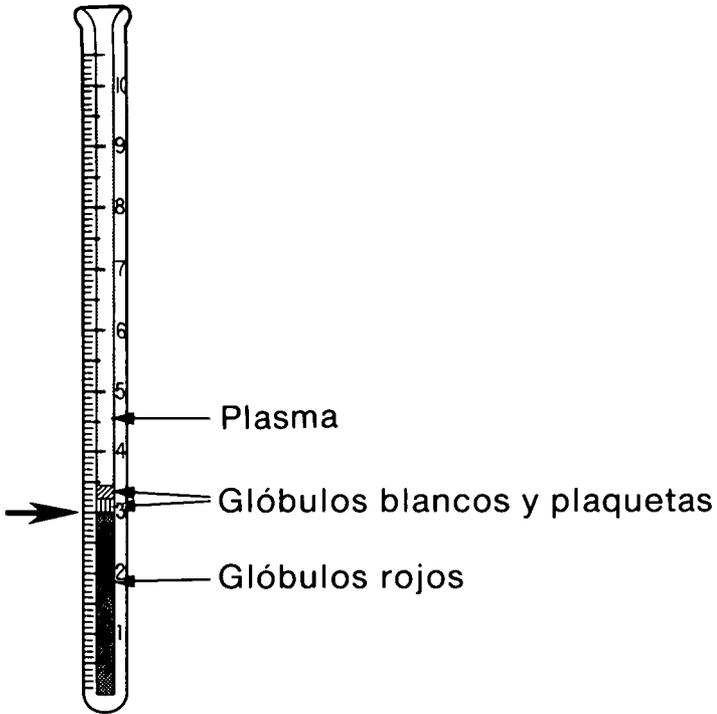


Fig. 11. Hematócrito en tubo de Wintrobe.

Fuentes de error

1. Concentración incorrecta de anticoagulante.
2. Mezclado inadecuado de la mezcla.
3. Mala oxigenación de la muestra durante el mezclado.
4. Coágulos en la muestra.
5. Almacenamiento de la muestra por más de 6–8 horas.
6. Centrifugación insuficiente, durante muy poco tiempo o a muy baja velocidad, que hacen que quede atrapada una cantidad excesiva de plasma.
7. Llenado incompleto de los tubos.
8. Lisis de la muestra durante la centrifugación; la causa puede ser el calentamiento de la centrifugadora; es posible detectarla por un tinte color rosa en la capa del tubo que corresponde al plasma.
9. Lectura incorrecta.

Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM)

Se calcula a partir de las mediciones de Hb y Hto como se indica a continuación:

$$\text{CHCM (g/l)} = \frac{\text{Hb (g/l)}}{\text{Hto (l/l)}}$$

NOTA: La CHCM se da en gramos por litro (g/l) porque la hemoglobina se da en g/l. En algunos textos se calcula en gramos por decilitro (g/dl); la diferencia es un factor de 10.

Control de calidad

El control de la CHCM se relaciona con el control de las pruebas individuales (es decir, Hb y Hto); también es una prueba apropiada para controlarla por medias diarias (ver p. 53), lo cual se efectúa de la siguiente manera:

1. Calcular la media de la CHCM para a) todos los pacientes y b) los pacientes con una Hb \geq 130 g/l durante un período de un mes.
2. Calcular diariamente la media de la CHCM para a) todos los pacientes y b) los pacientes con una Hb \geq 130 g/l.

En el caso de los valores medios de todos los pacientes, la media diaria no debe variar más de \pm 5%. Si la variación es mayor, los resultados de los "pacientes con Hb normal" indicarán si la variación ha sido causada por una distribución anormal de pacientes o por errores en las pruebas; en el último caso, la variación del grupo limitado será similar.

Recuento de reticulocitos

Principio

Los reticulocitos son glóbulos rojos juveniles sin núcleo, que conservan algunos residuos de ARN (y quizá de ribosomas) en el citoplasma. Cuando se tiñe con azul de metileno nuevo, el ARN se precipita como filamentos azulosos y gránulos dentro de los glóbulos rojos (ver microfotografías 25–48). Esta técnica también se emplea para demostrar la presencia de cuerpos de Heinz.

Equipo

1. Microscopio
2. Portaobjetos de vidrio de 25 × 75 mm

3. Pipetas de Pasteur
4. Tubos de 12 × 75 mm

Reactivo

1. Reactivo de azul de metileno nuevo:

Azul de metileno nuevo	0,5 g
Oxalato de potasio	1,6 g
Agua destilada	100 ml

NOTA: Filtrar el reactivo antes de usarlo. El azul de cresilo brillante es un sustituto adecuado del azul de metileno nuevo.

Muestra

Sangre venosa con EDTA o sangre capilar.

Procedimiento

1. Con una pipeta de Pasteur, agregar cantidades iguales de sangre y de azul de metileno nuevo (3 gotas de cada uno) a un tubo de 12 × 75 mm y mezclar. La dilución no es un factor crítico.
2. Dejar reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
3. Después de mezclar nuevamente, colocar una pequeña gota de la mezcla en un portaobjetos y hacer un extendido delgado. Dejar secar al aire.
4. Usando aceite de inmersión, contar 1 000 eritrocitos y anotar el número de reticulocitos encontrados.
5. Calcular el recuento de reticulocitos como se indica a continuación:

$$\text{Reticulocitos (\%)} = \frac{\text{No. de reticulocitos contados}}{\text{No. de glóbulos rojos contados}} \times 100$$

Para efectuar un ajuste en caso de anemia, calcular el recuento corregido (o absoluto) de reticulocitos (%) a partir de:

$$\text{Recuento observado (\%)} \times \frac{\text{Hto}}{0,45} \quad \text{ó} \quad \times \frac{\text{Hb (g/l)}}{150}$$

Todas las muestras de sangre normal presentan unos cuantos reticulocitos; en consecuencia, hay que incluir un extendido de sangre normal y examinarlo para ver si los reticulocitos se han teñido. Si es posible obtener un extendido con un recuento elevado de reticulocitos (por ejemplo, el extendido de un paciente con anemia hemolítica) también se debe incluir.

Fuentes de error

1. Cuerpos de Heinz que causan confusión, siderocitos y partículas de tinción precipitada con reticulocitos.
2. conteo en áreas del frotis donde los eritrocitos no están distribuidos con uniformidad. No debe haber superposiciones ni aglomeramientos en las áreas donde se efectúan los conteos.
3. En el caso de muestras de pacientes anémicos, empleo de una cantidad insuficiente de sangre en relación con el tinte. En tales casos, agregar seis gotas de sangre a tres gotas de tinte.
4. Esplenectomía. Da como resultado la presencia de otras inclusiones en los glóbulos rojos, las cuales se pueden confundir con los reticulocitos.

Extendidos de sangre

Principio

Una gota de sangre se extiende sobre un portaobjetos, se tiñe y se examina en el microscopio; de esta manera, es posible estudiar los glóbulos rojos, los leucocitos y las plaquetas. El objetivo consiste en establecer las características morfológicas de cada tipo de célula y en evaluar la frecuencia relativa de diferentes leucocitos. El portaobjetos se tiñe con alguna de las tinciones de Romanowsky; estas tinciones poseen propiedades de tinción diferentes, y es esencial elegir una y familiarizarse con ella. La tinción que se describe a continuación (de Wright) es bastante fiable y fácil de usar, aunque hay otras (por ejemplo, la de Leishman y la de May Grunwald Giemsa) que también son satisfactorias.

Equipo

1. Microscopio
2. Portaobjetos de vidrio de 25 × 75 mm
3. Cubreobjetos rectangulares
4. Adhesivo neutro
5. Aceite de inmersión
6. Rejilla para portaobjetos
7. Pipetas de Pasteur

Reactivos

1. Tinción de Wright:
Tinte de Wright 1 g
Alcohol metílico absoluto sin acetona 600 ml

Agregar el alcohol poco a poco, unos cuantos mililitros cada vez, y mezclar bien con la ayuda de 10 a 20 esferillas de vidrio. Conservar bien tapado para evitar la evaporación; guardar en un sitio oscuro durante dos o tres semanas y mezclar con frecuencia. Filtrar antes de usarlo.

La tinción de Leishman es un sustituto apropiado y quizá se prefiera, sobre todo en zonas donde prevalecen el paludismo y otros parásitos de la sangre.

2. Amortiguador:

Na_2HPO_4 2,56 g

KH_2PO_4 6,63 g

Agua destilada (cuanto baste para completar un litro)

3. Fijador:

Alcohol metílico absoluto. La botella debe conservarse bien tapada para evitar la hidratación, sobre todo en climas tropicales y húmedos.

Muestra

Muestra de sangre venosa con EDTA o sangre capilar.

Procedimiento

1. Primero, preparar un extensor con un portaobjetos, rompiendo una de las esquinas de un portaobjetos de vidrio de 25 × 75 mm; elegir uno que tenga los cantos lisos. En lugar del portaobjetos se puede utilizar un pedazo de plástico rígido de tamaño similar.

2. Colocar una pequeña gota de sangre a unos dos o tres milímetros del extremo de un portaobjetos limpio y seco; poner el portaobjetos extensor a un ángulo de 30° a 45° del portaobjetos y moverlo hacia atrás para que haga contacto con la gota, que debe extenderse rápidamente a lo largo de la superficie de contacto del extensor con el portaobjetos. El movimiento hacia adelante del extensor extiende la sangre sobre el portaobjetos. El extendido debe tener unos 30 mm de largo (figura 12). No hay que retirar el extensor del portaobjetos hasta que se haya extendido toda la sangre.

El espesor del extendido puede regularse cambiando el ángulo al que se sostiene el extensor, variando el tamaño de la gota de sangre y cambiando la presión y velocidad del extendido.

3. Dejar que los extendidos sequen al aire. Escribir el nombre del paciente y la fecha con lápiz en el borde del extendido.

4. Fijar los extendidos sumergiendo los portaobjetos en alcohol metílico absoluto durante dos o tres minutos. El color del frotis pasará de rojo a marrón claro. Es conveniente fijar los extendidos aunque la tinción tenga alcohol metílico absoluto.

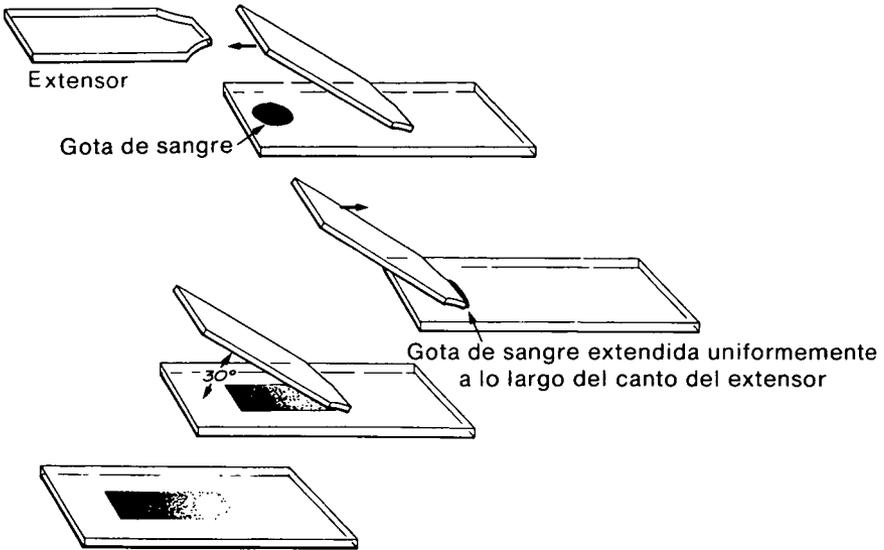


Fig. 12. Ilustración del método para preparar extendidos de sangre.

5. Cubrir el portaobjetos por completo con la tinción. Después de tres minutos, agregar una cantidad igual de amortiguador; soplar con suavidad para asegurar una mezcla uniforme. Aparecerá un resplandor verde metálico.

6. Después de otros cinco minutos, enjuagar muy bien con agua potable; primero, dejar salir el agua con mucha lentitud y luego con más fuerza para eliminar del extendido todo el exceso de tinte. Limpiar la parte posterior del portaobjetos para eliminar todos los restos de tinte. Secar al aire colocando el portaobjetos en posición vertical en una rejilla para portaobjetos. Cuando seque por completo, cubrir el extendido con un cubreobjetos rectangular, fijándolo en la posición correcta extendiendo una gota de adhesivo entre el porta y el cubreobjetos. Para fijaciones temporales suele usarse aceite de inmersión. El cubreobjetos es esencial porque permite examinar el extendido con bajo aumento; es preciso evitar la práctica de examinar los portaobjetos únicamente con la lente para aceite de inmersión. Los portaobjetos que se emplean como montaje temporal pueden volver a usarse.

7. Estudiar la morfología de los glóbulos rojos en todos los portaobjetos. El área más apropiada para clasificar los glóbulos rojos es aquella donde la gran mayoría de glóbulos rojos apenas se tocan, sin llegar a superponerse. Es necesario examinar el extendido para obtener un estimado global del recuento

total de leucocitos y de la distribución relativa de los distintos tipos de leucocitos, así como para identificar cualquier célula rara o anormal. También hay que calcular el número de plaquetas y observar la presencia de plaquetas anormalmente grandes.

Fuentes de error

1. Si el frotis presenta una coloración excesivamente azul, quizá el frotis sea muy grueso, no haya sido bien lavado, se haya teñido durante mucho tiempo o el amortiguador del tinte o el agua utilizados hayan sido muy alcalinos.

2. Si la tinción es muy roja, es probable que el tinte, el amortiguador o el agua hayan sido muy ácidos.

3. El tinte se precipita en el extendido; el tinte debe filtrarse todos los días antes de usarlo.

4. Muchos hematólogos consideran que la mejor morfología celular se obtiene con sangre que no contiene anticoagulante. Si se emplea sangre anticoagulada, el extendido debe prepararse, si es posible, de inmediato o por lo menos antes de que pase una hora desde que fue extraída la sangre, ya que un retraso mayor suele hacer que disminuya la calidad de la morfología.

5. Tal vez el extensor no haya estado limpio o su canto no haya sido liso.

6. Quizá el portaobjetos no haya estado limpio y haya tenido polvo, grasa o huellas dactilares. Es conveniente guardar los portaobjetos en un frasco con alcohol; antes de usarlos hay que limpiarlos con una tela que no suelte pelusa.

7. Es probable que el extendido no sea liso y uniforme, sino que presente ondas, orificios o bordes.

8. Una fijación inadecuada puede afectar la tinción y el aspecto morfológico. Las probabilidades de que esto suceda aumentan si el alcohol metílico no es "absoluto" y ha absorbido agua, por ejemplo, de un ambiente húmedo.

Extendidos espesos

Principio

Los extendidos espesos se emplean para diagnosticar el paludismo y otras enfermedades causadas por parásitos de la sangre.

Equipo

1. Microscopio
2. Portaobjetos de vidrio de 25 × 75 mm

3. Aceite de inmersión
4. Rejilla para portaobjetos
5. Pipetas de Pasteur

Reactivos

1. Tinción de Wright (ver p. 80)
2. Agua con amortiguador (ver p. 81)

Muestra

Sangre venosa con EDTA o sangre capilar.

Procedimiento

1. Colocar una pequeña gota de sangre en el centro de un portaobjetos y extenderla con la punta de otro portaobjetos formando un cuadrado. Para juzgar si el espesor es el correcto, colocar el portaobjetos sobre una hoja de periódico; la letra pequeña apenas debe verse a través de la sangre.
2. Secar el extendido dejando el portaobjetos sobre la parte superior de una lámpara de microscopio o a la luz del sol durante siete minutos.
3. Cubrir el portaobjetos por completo con agua con amortiguador durante dos segundos y desechar el agua.
4. Cubrir el portaobjetos con el tinte; después de tres minutos, agregar una cantidad igual de amortiguador. Soplar con suavidad para que se mezcle bien.
5. Después de otros cinco minutos, lavar el tinte suavemente con agua potable; limpiar los restos de tinte de la parte posterior del portaobjetos y dejar secar el portaobjetos en posición vertical en una rejilla.
6. Cuando esté completamente seco, examinar con la lente de aceite de inmersión.

Examen de la médula ósea

Principio

Las muestras de médula ósea se pueden obtener por aspiración o por biopsia con trefina y, normalmente, es un médico quien lo hace.

Aspiración

Como la médula ósea está compuesta de tejido blando, se pueden obtener muestras insertando una aguja apropiada en la médula y aplicando presión de vacío con una jeringa. En adultos y en niños de más de dos años de edad, las partes de las que se puede obtener normalmente tejido medular rico son: 1) el

esternón, la punción se efectúa en la línea media del esternón, a la altura del segundo espacio intercostal; 2) la espina ilíaca superior anterior o posterior; 3) la cresta ilíaca; y 4) la apófisis espinosa de las vértebras. Se dice que, de todos los sitios anteriores, el esternón es el que proporciona material más representativo, aunque es posible que el paciente muestre mayor ansiedad cuando se toma este tipo de muestra. Además, no se debe tratar de aspirar médula ósea por debajo del segundo espacio intercostal porque, si se perfora la capa cortical interna, los grandes vasos y el atrio derecho, que se encuentran bajo este espacio, pueden dañarse con consecuencias graves. En infantes, el sitio en que se lleva a cabo la punción es la superficie del extremo superior de la tibia, justo debajo del nivel de la protuberancia de la tibia.

Pueden utilizarse varios tipos de agujas para la médula ósea; en la figura 13 se ilustran dos que se recomiendan. La aguja debe conservarse en un paquete o tubo sellado, y hay que esterilizarla en una estufa de aire caliente o en un autoclave automático antes de usarla.

Procedimiento

1. Preparar una bandeja con a) la aguja para la médula ósea en su paquete esterilizado, b) una jeringa esterilizada de 2 a 10 ml, c) una jeringa de 1 ml y una aguja de inyección calibre 24–25, d) una solución de anestésico local, e) un desinfectante para la piel (por ejemplo, etanol al 70% o clorhexidina al 0,5%), f) seis o más portaobjetos de vidrio limpios y secos, g) una pipeta de Pasteur, h) un extensor de portaobjetos (ver p. 82) y i) toallas, algodón y gasas esterilizadas y un vendaje enyesado.

2. Lavar la piel del área elegida; afeitar si tiene vello y limpiar varias veces con una torunda empapada en la solución desinfectante, moviendo siempre la torunda en la misma dirección.

A continuación, hay que anestesiar la piel y el periostio con una solución esterilizada de anestésico local al 1% o 2%; comenzar penetrando la capa más superficial de piel, luego hacer avanzar la aguja hasta que toque el hueso e inyectar de nuevo el anestésico. La cantidad total utilizada no debe exceder de 3 a 5 ml. Observar la profundidad a la que penetra la aguja antes de alcanzar el hueso, ya que servirá para indicar a qué profundidad tiene que penetrar la aguja para la médula ósea. Si se elige el esternón para efectuar la punción, la aguja para la médula ósea debe estar provista de una protección que se ajuste a la longitud apropiada.

Introducir la aguja para la médula ósea en posición vertical, penetrando la piel con un ligero movimiento de rotación hasta llegar al hueso y sentir cómo cede de súbito al entrar en la cavidad de la médula. En este punto, retirar el estilete de la aguja y colocar la jeringa; succionar retirando el émbolo hasta

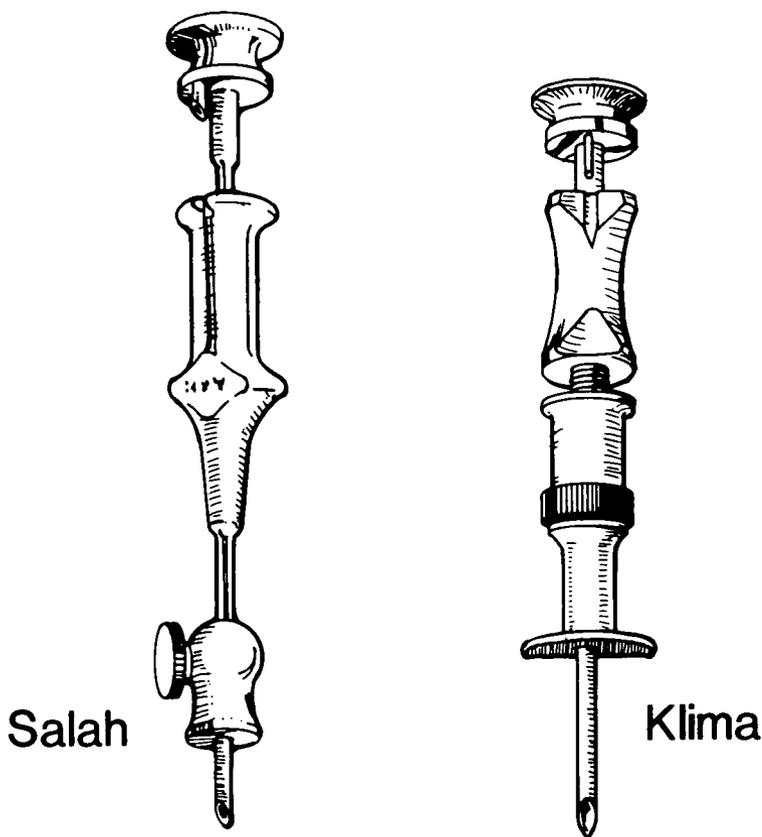


Fig. 13. Agujas Klima y Salah para aspiración de médula ósea.

que aparezca la primera gota de sangre en la jeringa y retirar la aguja. La aspiración de la médula ósea resulta dolorosa para el paciente, y la aspiración de grandes volúmenes se asocia con cantidades cada vez mayores de sangre periférica que diluyen la muestra de médula ósea, aproximadamente en la misma proporción que el volumen aspirado. Es necesario presionar manualmente el sitio de la aspiración con una gasa esterilizada durante algunos minutos hasta que deje de sangrar. Después, colocar una gasa limpia en el sitio de la aspiración y dejarla ahí durante 24 horas.

3. Colocar una pequeña gota de la médula aspirada en uno de los extremos de cada portaobjetos de vidrio; succionar de inmediato el exceso de sangre con una pipeta de Pasteur, dejando en el portaobjetos las partículas de médula.

Extender el material de la misma manera que con los frotis de sangre (ver p. 82).

4. Dejar secar los extendidos al aire; fijar con alcohol metílico. Teñir algunos extendidos con tinción de Wright (ver p. 80) y dejar uno para determinar el contenido de hierro (ver p. 84). Cubrir los extendidos teñidos con cubreobjetos, empleando un adhesivo neutro o una gota de aceite de inmersión.

5. Examinar primero los portaobjetos a simple vista para detectar las partículas de médula, que aparecen en el extendido como áreas de color más oscuro y forma irregular que se destacan en la tinción rosa o violeta uniforme del resto del frotis. Observar con cuidado la vecindad inmediata de las zonas oscuras, donde se puede evaluar con facilidad la celularidad de la médula ósea. El extendido de médula se debe examinar por completo con bajo aumento (por ejemplo, X100, que permite al observador estimar la relación cuantitativa que existe entre el tejido graso y las células hemopoyéticas, el número de megacariocitos, de células del plasma y de mastocitos). Este aumento también permite detectar células gigantes (osteoblastos, osteoclastos, células malignas, folículos linfoides y granulomas). Es necesario examinar todo el extendido; sólo se debe emplear un aumento mayor después de haber seleccionado un área representativa del frotis para efectuar un estudio detallado y un recuento diferencial. El área ideal para este propósito es aquella en que las células hemopoyéticas constituyen una capa monocelular y en la cual los glóbulos rojos están teñidos de color rosa. En la introducción de este libro, se habla de las características que se deben estudiar y de su importancia. En las microfotografías 25–48 se ilustra el aspecto de la médula ósea en sujetos normales y en distintos trastornos.

Biopsia con trefina

Principio

Se trata de una investigación más especializada que requiere más experiencia y recursos. Debe efectuarse cuando la médula obtenida por aspiración no sirve para el examen, lo que, en general, sucede en pacientes con anemia aplásica o mielofibrosis. El procedimiento se efectúa con una aguja de biopsia, como la aguja de Jamshidi-Swaim (figura 14); el lugar más adecuado es la espina iliaca superior y posterior.

Procedimiento

1. Preparar la bandeja que se describe en la p. 85 e incluir una aguja esterilizada de trefina y una botella que contenga 2 ml de líquido de Helly,

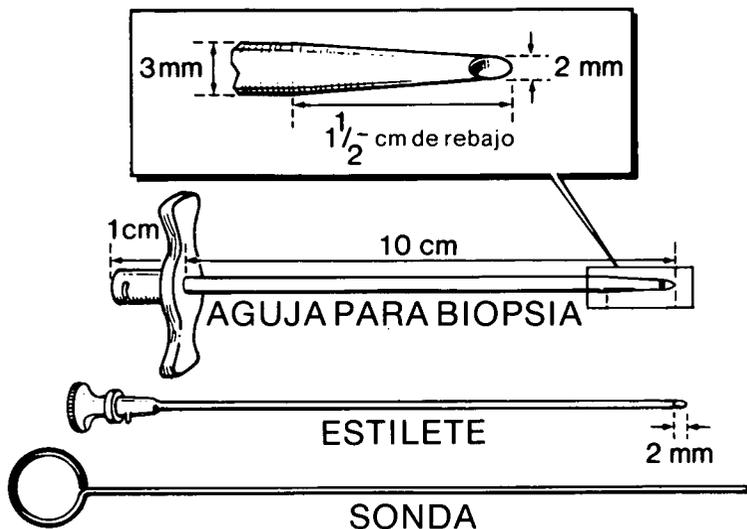


Fig. 14. Aguja Jamshidi-Swaim para biopsia de médula ósea.

compuesto de dicromato de potasio, 2,5 g; cloruro de mercurio, 5 g; formaldehído (formol al 40%), 5 ml; y agua, 100 ml.

2. Preparar el lugar donde se efectuará la biopsia como se indica en la p. 00. La trefina se inserta mediante un movimiento giratorio de un lado a otro. Cuando la persona que realiza la biopsia siente que se ha alcanzado la profundidad adecuada en la médula, se hace girar la trefina diez veces en el sentido de las manecillas del reloj y en sentido inverso; luego se retira y el material que se encuentra en el lumen se vierte en el líquido de Helly usando el obturador. El sitio donde se efectuó la biopsia se trata de la misma forma que cuando se realiza una aspiración.

3. Enviar el material, en el líquido de Helly, a un laboratorio central sin dilación para su procesamiento, preparación de cortes y tinción.

Estimación del contenido de hierro de la médula ósea

Principio

Por medio de una tinción citoquímica, es posible visualizar y evaluar cuantitativamente la cantidad de hierro de la médula ósea. Esta evaluación es

de vital importancia para el diagnóstico de la anemia ferropénica, β -talasemia y anemia sideroblástica.

La prueba se basa en la reacción del azul de Prusia (reacción de Perls). El hierro iónico reacciona con una solución de ferrocianuro ácido para producir una coloración azul.

Equipo

1. Frasco para tinción
2. Cubreobjetos
3. Aceite de inmersión

Reactivos

1. 0,2N ácido clorhídrico en agua:

Verter, sin dejar de agitar, 2 ml de solución de ácido clorhídrico concentrado en 98 ml de agua destilada fría; esta solución se mantiene estable a temperatura ambiente durante varios meses.

2. 20 g/l de ferrocianuro de potasio en agua destilada:

Esta solución también se mantiene estable a temperatura ambiente durante varios meses.

3. Solución de fucsina básica o eosina:

1 g de fucsina básica o eosina en 100 ml de agua destilada; se mantiene estable a temperatura ambiente durante varias semanas.

Procedimiento

1. Seleccionar uno de los frotis de médula ósea fijados con metanol (ver p. 87) que contenga partículas.

2. Mezclar volúmenes iguales de las soluciones de 0,2N ácido clorhídrico y de 20 g/l ferrocianuro de potasio en un frasco para tinción. Colocar el portaobjetos en esta mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos; lavar bien en agua potable durante 20 minutos y contrateñir con la solución diluida de fucsina o eosina durante cinco minutos; enjuagar bien en agua potable y luego en alcohol etílico absoluto durante dos minutos; por último, enjuagar de nuevo en agua potable. Una vez que los frotis se secan al aire, están listos para ser examinados.

Interpretación

Los gránulos de hierro aparecen como agregados de color azul brillante o azul verdoso, que se destacan muy bien sobre el fondo color rosa. Tales gránulos, que no suelen exceder de 1 μm de diámetro, aparecen en el citoplasma de los precursores eritroides nucleados o no nucleados (los pri-

meros reciben el nombre de sideroblastos; los segundos, de siderocitos) en diferentes cantidades. Si los gránulos rodean a los núcleos, constituyen los llamados sideroblastos anillados. A menudo, los gránulos de hierro también se pueden observar en las células reticuloendoteliales de la médula ósea y suelen tener forma esférica o irregular.

Por lo tanto, la reserva de hierro del organismo puede evaluarse con exactitud mediante el examen cuidadoso del hierro de las células reticuloendoteliales. De igual forma, se puede efectuar una estimación cuantitativa y cualitativa de la cantidad de hierro presente en los normoblastos mediante el examen (con aceite de inmersión) de los precursores de los glóbulos rojos. Normalmente, del 25% al 50% de los normoblastos presentan de uno a cuatro pequeños gránulos; si hay deficiencia de hierro, es raro observar alguno. Los pacientes que tienen una síntesis anormal de hem presentan un notable incremento en la cantidad de gránulos de hierro y, si existen problemas de síntesis en las mitocondrias (anemia sideroblástica), se observará una gran cantidad de sideroblastos “anillados”. Los pacientes con defectos de síntesis citoplásmica (es decir, talasemia) presentan un número mayor de gránulos de hierro de gran tamaño diseminados por todo el citoplasma (microfotografías 25–48).

Si hay destrucción de células eritroides en la médula (como en la anemia diseritropoyética) o en el caso de una anemia secundaria a una inflamación, se observa una cantidad excesiva de hierro en las células reticuloendoteliales.

Detección de metahemalbúmina

Principio

La metahemalbúmina posee una absorción característica en la franja roja (a 624 nm), que se puede observar mediante un espectroscopio. Si se convierte el pigmento a un hemacromógeno de amonio, se puede ver una franja más intensa en la parte verde del espectro (558 nm). Este procedimiento se conoce como prueba de Schumm.

Equipo

1. Centrifugadora de mesa
2. Espectroscopio manual
3. Tubos de 12 × 75 mm

Reactivos

1. Sulfato de amonio amarillo saturado (acuoso)
2. Eter

Procedimiento

1. Centrifugar una muestra de sangre (simple o con anticoagulante) a alrededor de 2 000 rpm durante 10 a 15 minutos para separar del suero (o plasma) todos los glóbulos rojos y la capa amarillo blancuzca de glóbulos blancos y plaquetas.

2. Observar con un espectroscopio manual a buena luz natural y ver si hay una banda en la parte roja del espectro.

3. Cubrir el suero con una capa de éter.

4. Agregar un volumen de 1/10 de sulfato de amonio amarillo saturado y mezclar.

5. Observar con el espectroscopio y ver si hay una banda en la parte verde del espectro (Microfotografía 48).

Significado

La metahemalbúmina se produce en la anemia hemolítica, sobre todo si la hemólisis es intravascular.

Detección de hemoglobinuria

Principio

Si la orina está pigmentada (color rosa, rojo, marrón o negro), el examen con un espectroscopio puede demostrar la presencia del pigmento de la Hb.

Equipo

1. Espectroscopio manual
2. Tubos de 12 × 75 mm

Procedimiento

1. Si es necesario, filtrar o centrifugar la muestra de orina para obtener una solución clara.

2. Examinar con un espectroscopio manual a buena luz natural, y ver si no hay ninguna banda que corresponda a la oxihemoglobina en la parte amarilla o verde, o a la metahemoglobina en la parte roja (microfotografía 48).

Fuentes de error

Es preciso distinguir la hemoglobinuria de la hematuria examinando con un microscopio una gota de orina colocada sobre un portaobjetos. En la hematuria, se observan glóbulos rojos intactos. La orina debe ser fresca para evitar la lisis *in vitro* de los glóbulos rojos en la hematuria (que daría como

resultado una hemoglobinuria artificial) y para evitar la creación de productos resultantes de la degradación de la hemoglobina.

Significado

La hemoglobinuria se presenta en casos severos de hemólisis intravascular; suele relacionarse con la hemosiderinuria, salvo al inicio del ataque hemolítico. A fin de confirmar la presencia de hemosiderinuria, es necesario examinar con el microscopio un sedimento urinario teñido apropiadamente para demostrar la presencia de hierro que contiene células renales tubulares.

Prueba de lisis de la sucrosa

Principio

Se trata de una prueba eliminatoria de la hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), basada en el estudio de la fragilidad de los glóbulos rojos.

Equipo

1. Tubos de ensayo de 12 × 75 mm
2. Pipetas de Pasteur
3. Centrifugadora
4. Solución salina normal

Reactivos

1. Solución de sucrosa, 92,4 g/l

Se puede guardar a 4°C durante dos semanas, o indefinidamente si se congela.

Procedimiento

1. Tomar una muestra de sangre del paciente y colocarla en una solución de ácido-citrato-dextrosa (ACD), en heparina o en EDTA.
2. Lavar unas cuantas gotas de esta sangre en solución salina normal dos veces y preparar una suspensión del 50% aproximadamente de glóbulos rojos en solución salina normal.
3. Preparar dos tubos de ensayo con una gota de suero normal fresco (grupo AB o ABO, compatible con la sangre del paciente).
4. Agregar al tubo uno, 17 gotas de solución de sucrosa y al tubo dos, 17 gotas de solución salina normal.
5. Agregar a cada tubo dos gotas de la suspensión lavada de glóbulos rojos para igualar las 17 gotas del paso 4.

6. Incubar a 37°C durante 30 minutos.
7. Centrifugar y examinar para ver si hay lisis.

Significado

La prueba es positiva para HPN si la lisis es claramente visible en el tubo que contiene sucrosa, pero no en el tubo con solución salina. Si la prueba arroja un resultado positivo en los dos tubos, repetir empleando un suero diferente y, si es necesario, una muestra de sangre fresca.

Testigo

Si la prueba resulta positiva con las células de pacientes, es necesario enviar una muestra de la sangre del paciente en ACD a un laboratorio central para efectuar una prueba de lisis de suero acidificado, que es la prueba definitiva de confirmación de la HPN.

Prueba directa de globulina antihumana (de Coombs)

Principio

Si se agrega globulina antihumana, obtenida de la inmunización de animales (por lo común conejos) con suero humano, a glóbulos rojos recubiertos de un anticuerpo incompleto, se produce una aglutinación. Un suero de amplio espectro contiene elementos anti IgG y anticomplemento.

Equipo

1. Portaobjetos de vidrio o azulejo blanco
2. Centrifugadora de mesa
3. Tubos de ensayo de 12 × 75 mm
4. Pipetas de Pasteur

Reactivos

1. Suero de globulina antihumana (reactivo de Coombs)
2. Solución salina (8,5 g/l NaCl)
3. Glóbulos rojos "testigo" (ver más adelante)

Procedimiento

1. Colocar una muestra de sangre del paciente en ACD o EDTA.
2. Lavar una muestra de glóbulos rojos cuatro veces en un gran volumen de solución salina calentada a 37°C y preparar una suspensión del 10% al 20% en solución salina.

3. Pipetear en los cuadrados del azulejo: a) una gota de suero antiglobulina a la dilución óptima* para la anti IgG, b) una gota a la dilución óptima para anticomplemento, y c) una gota de solución salina.

4. Pipetear una gota de la suspensión de glóbulos rojos en cada uno de los cuadrados del azulejo.

5. Mezclar las suspensiones de glóbulos rojos y suero con un palito de madera y balancear el azulejo con suavidad de vez en cuando, mientras se observa bajo una luz durante un período adecuado.

6. Si los resultados son negativos, agregar una gota de células “testigo” sensibilizadas del tipo apropiado a cada uno de los cuadrados y balancear el azulejo durante otros cinco minutos. Si el suero antiglobulina es satisfactorio, los dos cuadrados deben presentar aglutinación. Si se produce aglutinación en el cuadrado que sólo contiene solución salina, repetir la prueba después de volver a lavar otra muestra de la suspensión de glóbulos rojos a 37°C.

Testigos

1. Células sensibilizadas a la IgG

Incubar a 37°C durante una hora un volumen de la suspensión al 50% de glóbulos rojos lavados del grupo Rh₀ (D) positivo con diez volúmenes de un suero incompleto anti D. Lavar cuatro veces en solución salina y preparar una suspensión del 10% al 20%.

2. Células sensibilizadas al complemento

Preparar una suspensión con cuatro gotas de sangre fresca entera del grupo O (sin anticoagulante) en 2 ml de una solución de 60 g/l de sucrosa en 0,02 M NaCl. Incubar a 37°C durante 15 minutos. Lavar cuatro veces en solución salina.

3. Células normales

Lavar células frescas normales (no sensibilizadas) cuatro veces en solución salina y preparar una suspensión del 10% al 20% en solución salina.

4. Normalización de suero antiglobulina

a. Con una pipeta de Pasteur, preparar diluciones por cuadruplicado del suero antiglobulina en solución salina, de 1 en 4 a 1 en 4,096 y colocar una gota de cada dilución en tres cuadrados de un azulejo, uno debajo del otro.

b. Agregar una gota de la suspensión de células sensibilizadas a la IgG a cada dilución de suero de la parte superior del azulejo. Agregar una gota de células sensibilizadas al complemento a cada dilución de suero de la hilera

* Muchos sueros comerciales de “amplio espectro” ya vienen diluidos.

intermedia del azulejo. Agregar una gota de células normales no sensibilizadas a cada dilución de suero de la hilera inferior del azulejo.

c. Mezclar las suspensiones de células y suero con un palito de madera y balancear el azulejo con suavidad de vez en cuando mientras se le observa bajo una luz durante 10 minutos.

d. Tomar nota de:

1. Tiempo necesario para que se produzca una aglutinación bien definida.
2. Cuáles son las diluciones óptimas para la aglutinación de las células sensibilizadas a la IgG y al complemento.
3. Ausencia de aglutinación en las células no sensibilizadas.

Interpretación

Una prueba positiva indica la presencia de autoanticuerpos, aunque no siempre constituye un diagnóstico de anemia hemolítica autoinmune. Una prueba positiva también puede resultar de a) absorción en los glóbulos rojos de anticuerpos o complejos drogas-antidrogas (por ejemplo, penicilina, quinidina, fenacetina) o b) daño en la superficie de los glóbulos rojos causado por ciertas drogas, tales como cefalotina y metildopa. Si la prueba de antiglobulina es positiva, el laboratorio central debe efectuar otros estudios para determinar si los glóbulos rojos están cubiertos de inmunoglobulinas, sólo de complemento, o de ambos, y para identificar los tipos de anticuerpos presentes. En este caso, es mejor enviar sangre en ACD; es probable que el laboratorio también necesite una muestra de suero.

Fuentes de error

a. Positivo falso:

1. Sensibilización *in vitro* producida por anticuerpos naturales o por el complemento cuando se deja reposar la sangre, sobre todo a 4°C durante algún tiempo.

2. Lavado inadecuado de las células.

3. Suero antiglobulina mal absorbido, que contiene anticuerpos inespecíficos que reaccionan con las células no sensibilizadas.

4. Reacción con el sílice coloidal de los tubos de vidrio.

5. Recuento elevado de reticulocitos en la muestra de sangre.

6. Presencia de albúmina en el suero antiglobulina.

7. Contaminación bacteriana.

b. Negativo falso:

1. La reacción de la prueba no se continuó durante el tiempo necesario para alcanzar la aglutinación.

2. Dilución incorrecta del suero antiglobulina.
3. Suero antiglobulina relativamente impotente.
4. El anticuerpo es IgA, que no reacciona con el suero antiglobulina de amplio espectro, ya que éste no suele contener anti IgA. Si los síntomas del paciente indican una anemia hemolítica autoinmune y la prueba arroja resultados negativos, es necesario repetirla con un suero anti IgA, para lo cual suele ser necesario enviar una muestra a un laboratorio central.
5. Deterioro del suero antiglobulina a causa de la contaminación y el mal almacenamiento.
6. Lavado inadecuado de los glóbulos rojos, de manera tal que las inmunoglobulinas o el complemento del plasma neutralizan los antisueros.
7. Elución del anticuerpo durante el lavado. No hay que lavar las células hasta que se vayan a efectuar las pruebas.
8. Empleo de glóbulos rojos viejos.
9. Azulejo o portaobjetos sucios.
10. Película residual de jabón en los azulejos o portaobjetos, producida por un lavado defectuoso después de la limpieza.

Prueba de azul de cresilo brillante para cuerpos de inclusión

Principio

Las hemoglobinas inestables se desnaturalizan con gran facilidad dentro de los glóbulos rojos; la hemoglobina desnaturalizada aparece como cuerpos teñidos en el interior de la célula. También se puede inducir la formación de estos cuerpos de inclusión con un colorante oxidorreductor (azul de cresilo brillante) en la sangre que contiene hemoglobinas inestables.

Equipo

1. Microscopio
2. Portaobjetos para microscopio, aceite de inmersión
3. Baño de agua a 37°C
4. Papel filtro
5. Tubos de ensayo de 12 × 75 mm y gradilla para tubos
6. Pipetas de Pasteur

Reactivos

1. Tinte de azul de cresilo brillante:	
Solución de citrato de sodio al 3%	10 ml
8,5 g/l NaCl	40 ml
Azul de cresilo brillante (soluble en agua)	40 ml

Procedimiento

1. Mezclar bien el tinte antes de usarlo y filtrar una pequeña cantidad con un papel filtro.
2. Agregar dos gotas de sangre fresca anticoagulada a una gota del tinte filtrado en un tubo de ensayo pequeño.
3. Incubar en un baño de agua a 37°C.
4. Preparar frotis a los 20 minutos, una hora y dos horas en portaobjetos de vidrio limpios. Retirar el tubo del baño de agua, dejar durante toda la noche a temperatura ambiente y preparar otros frotis a las 16 a 24 horas.

Testigo

Junto con la muestra de la prueba se debe examinar una muestra de sangre que se sabe es normal y que tiene más o menos la misma edad que la muestra de la prueba. Si se dispone de una muestra inestable conocida; hay que examinarla como testigo anormal. La sangre de un paciente que haya tenido una esplenectomía también puede servir como testigo positivo.

Resultados

Las inclusiones preexistentes de hemoglobina están presentes en casi todos los glóbulos rojos de pacientes con anemia producida por cuerpos de Heinz, que han sido sometidos a una esplenectomía. Los cuerpos de inclusión inducidos aparecen después de la incubación; tales inclusiones tienen el aspecto de múltiples cuerpos azul verdosos dispuestos en un patrón de punteado semejante al de una pelota de golf; se presentan en la β -talasemia y en las hemoglobinas inestables, y son diferentes de los reticulocitos que contienen filamentos azul oscuros (microfotografías 46 y 47). Los testigos normales no presentan cuerpos de inclusión después de la incubación.

Fuentes de error

1. Si hay un exceso de EDTA, la tinción suele ser deficiente.
2. La capacidad de tinción de las soluciones viejas suele ser menor; lo mejor es preparar el tinte en pequeños lotes y filtrar la solución antes de usarla.

3. La capacidad de tinción del tinte de diferentes lotes varía. Comparar cada nuevo lote de tinte con muestras “testigo” normales y anormales.

Prueba eliminatória para glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

Método fluorescente

Principio

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-FD) cataliza la oxidación de la glucosa-6-fosfato (G-6-F) en los patrones del metabolismo de la glucosa. Luego reduce el NADP o TPN a NADPH o TPNH; el NADPH o TPNH reducido es fluorescente si se lo expone a una luz UV de onda larga. Si se mezcla sangre entera con el reactivo de la G-6-FD, la reacción de reducción se produce (es decir, hay fluorescencia) si está presente la G-6-FD. Ya se han publicado las recomendaciones del CINH en cuanto a este método.

Equipo

1. Luz ultravioleta de onda larga
2. Pipeta de 1 ml
3. Pipetas de 10 μ l
4. Tubos de ensayo de 10 \times 75 mm
5. Papel filtro Whatman No. 1

Reactivos

1. Glucosa-6-fosfato 10 mmol/l – 305 mg de sal disódica en 100 ml de agua.
2. β -NADP, 7,5 mmol/l – 600 mg de sal disódica en 100 ml de agua.
3. Saponina al 1%
4. Solución amortiguadora tri/HCl, 750 mmol/l, pH 7,8

Tri (hidroximetil) aminometano, 90,86 g/l	250 ml
1N-HCl	33 ml
Agua	(cuanto baste para completar 1 litro)
5. GSSG (Glutación oxidado), 8 mmol/l-490 mg en 100 ml de agua.
6. H₂O destilada

Si se conservan a -20°C , los reactivos permanecen estables durante años.

Solución de reactivos combinados

Se puede preparar solución nueva antes de cada lote de pruebas, aunque la solución permanece en buen estado durante dos años si se la guarda a -20°C

o durante un mes a 4°C. La solución está compuesta de 2 ml de G-6-FD; 1 ml de NADP; 2 ml de saponina; 3 ml de amortiguador; 1 ml de GSSG; 1 ml de agua. Algunos fabricantes suministran el reactivo en forma de un estuche listo para ser usado; hay que seguir las instrucciones del fabricante para reconstituir los reactivos.

Procedimiento

1. Pipetear 0,1 ml de reactivo recién preparado y dejar reposar a temperatura ambiente.
2. Pipetear 10 µl de sangre entera (con EDTA, ACD o heparina) en el tubo de ensayo y mezclar; enjuagar la pipeta con la mezcla varias veces.
3. De inmediato, y después a los cinco y a los diez minutos, formar una mancha de 4 a 10 mm de diámetro con la mezcla de reactivo y sangre en un papel filtro Whatman del No. 1.
4. Dejar que la mancha seque a temperatura ambiente.
5. Examinar las manchas secas con luz ultravioleta de onda larga.

Resultados

Las muestras de personas normales presentan una gran fluorescencia; los glóbulos rojos con menos del 20% de la actividad normal no presentarán ninguna fluorescencia.

Testigo

Debe usarse como testigo una muestra de sangre que se sepa es normal; verificar el estado del reactivo haciendo una mancha en el papel filtro inmediatamente después de mezclar la sangre y el reactivo; esta mancha testigo no debe presentar fluorescencia. Después del paso de incubación, hacer otra mancha; si el reactivo funciona bien, la muestra tiene que presentar fluorescencia.

Precauciones

1. Con este método se pasan por alto algunos heterocigotos femeninos, pero es fiable para detectar deficiencias en los varones. La identificación con fiable de los heterocigotos femeninos requiere una prueba citoquímica o un ensayo cuantitativo, que son pruebas relativamente complicadas.
2. Es preciso examinar la sangre tan pronto como sea posible después de extraerla, ya que las condiciones que causan una pérdida de actividad enzimática (por ejemplo, el almacenamiento inapropiado de la sangre entera y la hemólisis resultante) invalidan los resultados de las pruebas, aunque la sangre en ACD puede usarse durante tres semanas si se conserva a 4°C.

3. Examinar las manchas para ver si presentan fluorescencia sólo después de que hayan secado y antes de que transcurran 24 horas de la aplicación de la muestra.

4. Verificar las fechas de caducidad de los estuches comerciales de reactivos.

Prueba de reducción de la metahemoglobina

Este método puede emplearse como alternativa del método fluorescente en aquellos laboratorios que no cuenten con una luz ultravioleta adecuada.

Principio

La metahemoglobina se forma gracias a la acción del nitrito en los glóbulos rojos. La metahemoglobina se reduce en presencia de azul de metileno; la velocidad de la reducción es proporcional a la actividad de la G-6-FD de la célula.

Reactivos

1. Nitrito de sodio y solución de glucosa combinados: colocar 1,25 g de nitrito de sodio y 5 g de glucosa en un matraz con 100 ml de agua destilada.

2. Azul de metileno: colocar 0,15 g de cloruro de azul de metileno trihidratado en 1 000 ml de agua destilada.

Preparación de los tubos de vidrio

Pueden emplearse frascos de vidrio de tapa roscada o pequeños tubos de ensayo.

1. Tubos para la muestra: pipetear 0,1 ml exactos de la solución de glucosa y nitrito de sodio y 0,1 ml de la solución de azul de metileno en este tubo.

2. Tubo de referencia positiva: pipetear 0,1 ml de la solución de glucosa y nitrito de sodio en este tubo (omitir el azul de metileno).

3. Tubo de referencia normal: en este tubo no se coloca ningún reactivo. La prueba se puede efectuar pipeteando directamente la sangre en los tubos preparados como se mencionó antes, o las soluciones de los tubos 1 y 2 se pueden dejar evaporar hasta que sequen a temperatura ambiente y agregar la sangre a los reactivos secos. Los tubos que contienen reactivos secos pueden prepararse con anticipación, taparse y guardarse a temperatura ambiente durante seis meses por lo menos.

Procedimiento

1. Agregar 2 ml de sangre (con EDTA, ACD o heparina) al tubo de la muestra.

2. Agregar 2 ml de sangre (normal, deficiente o desconocida) a los tubos de referencia positiva y de referencia normal. Sólo se necesita un tubo de referencia positiva y un tubo de referencia normal para cada lote de pruebas.
3. Mezclar bien invirtiendo repetidas veces.
4. Incubar a 37°C durante tres horas sin tapar ni agitar.
5. Después de incubar, agregar 0,1 ml de la mezcla de la prueba a 10 ml de agua; comparar visualmente de dos a diez minutos más tarde con las referencias en diluciones similares.

Interpretación

Normal: rojo claro, como el tubo de referencia normal. Deficiencia de G-6-FD, expresión completa: marrón, como el tubo de referencia positiva. Mujeres intermedias: el color varía entre rojo y marrón según el grado de expresión del rasgo.

Precauciones

1. Con este método se pasan por alto el 50% de los heterocigotos femeninos.
2. El almacenamiento inadecuado de la sangre entera produce una pérdida de la actividad enzimática. La sangre con EDTA y la sangre heparinizada deben examinarse de inmediato o, si se conservan a 4°C, en un plazo máximo de 8 horas. La sangre con ACD se puede utilizar hasta 36 horas después, si se conserva a 4°C.
3. La anemia severa afecta los resultados. Si el Hto es de menos de 0,30, hay que extraer una cantidad suficiente de plasma para ajustar el Hto de 0,4 a 0,5 aproximadamente.

Pruebas para determinar la tendencia al desarrollo de hemáties falciformes en la sangre

Reducción con metabisulfito de sodio

Principio

En casos de anoxia, los eritrocitos que contienen hemoglobina S adquieren la forma falciforme característica. El metabisulfito reduce la cantidad de oxígeno y, por ende, si se agrega una solución de metabisulfito a la sangre y se sella esta mezcla para estudiarla con un microscopio a diferentes intervalos de tiempo, los eritrocitos que contengan hemoglobina S se volverán falciformes.

Precauciones

1. Preparar el reactivo el día que se va a utilizar, ya que no puede guardarse.
2. No dejar que el portaobjetos seque antes de examinarlo.
3. Esperar un mínimo de 24 horas antes de informar que una prueba arrojó resultados negativos en cuanto a las células falciformes.
4. No efectuar la prueba poco tiempo después de una transfusión, ya que los resultados no serán fiables.
5. Suelen producirse resultados negativos falsos con muestras de sangre umbilical y con muestras que tienen un porcentaje bajo de hemoglobina falciforme, que es una característica de algunos casos hereditarios.
6. La concentración del metabisulfito de sodio es importante. Suelen producirse positivos falsos a causa de la crenación ocasionada por las soluciones hipertónicas. Suelen producirse resultados negativos falsos si la solución hipotónica forma esferocitos.



Fig. 15. Preparación de células con hematíes falciformes.

Pruebas de solubilidad de la hemoglobina

Principio

La hemoglobina de las células falciformes es insoluble cuando se encuentra en el estado desoxigenado en una solución amortiguadora con un alto contenido de fosfato. En este estado reducido, la hemoglobina forma tactoides (cristales), que refractan los rayos de luz y producen una solución turbia.

Equipo

1. Tubos de ensayo de vidrio de 12 × 75 mm y gradilla para tubos
2. Micropipetas de 20 µl
3. Pipetas de 2 ml
4. Tarjeta blanca con líneas negras

Reactivo

1. Fosfato dibásico de potasio, anhidro,
K₂HPO₄ – 1,24 M 215 g
2. Fosfato monobásico de potasio, cristales,
KH₂PO₄ – 1,24 M 169 g
3. Ditionito de sodio, Na₂S₂O₄ 5 g
4. Saponina 1 g
5. H₂O destilada (cuanto baste para completar 1 litro)

Disolver el K₂HPO₄ en agua destilada antes de disolver el KH₂PO₄; luego, agregar el ditionito y la saponina.

Procedimiento

1. Pipetear 2 ml de reactivo en un tubo de ensayo de 12 × 75 mm.
2. Dejar que el reactivo se caliente a la temperatura ambiente.
3. Agregar 20 µl de sangre con EDTA o heparina.
4. Mezclar y esperar 5 minutos.
5. Sostener el tubo a 2,5 cm de la parte delantera de la tarjeta blanca con líneas negras.
6. Leer la turbidez.

Testigo

Examinar un testigo positivo y uno negativo con cada grupo de pruebas de solubilidad. La mezcla de reactivo y sangre presenta un color rojo claro o rosa; un color naranja claro indica que el reactivo se ha deteriorado, por lo común, debido al deterioro del ditionito de sodio en el reactivo.

Resultados

Una solución muy turbia indica un resultado positivo de hemoglobina falciforme. En este caso, las líneas negras de la tarjeta blanca no se pueden ver a través de la solución.

El resultado de la hemoglobina falciforme es negativo si las líneas negras se pueden ver a través de la solución de sangre y reactivo. Quizá la solución aparezca transparente o un poco turbia, pero las líneas siguen siendo visibles. La mayor parte de las hemoglobinas, incluyendo la A, F, C, D, G y A₂, arrojan resultados negativos.

Precauciones

1. Los factores que producen resultados positivos falsos incluyen la policitemia, colocación de un exceso de sangre en relación con la cantidad de reactivo, disglobulinemia, transfusión reciente de sangre que contiene HbS e hiperlipidemia.

2. Los resultados negativos falsos se deben a reactivos inactivos o caducos, transfusión reciente de sangre normal, porcentaje bajo de hemoglobina falciforme en la sangre de recién nacidos e infantes de menos de seis meses de edad y anemia en la que el valor de la hemoglobina es de menos de 70 g/l.

3. La mala calidad de la saponina y los derivados del ditionito y el no usar en los reactivos formas anhidras de las sales de potasio producen resultados inexactos.

Estimación de la hemoglobina A₂

En una muestra de sangre se puede separar la Hb A₂ de la Hb A mediante electroforesis. La mayoría de las personas normales tienen un pequeña cantidad de Hb A₂, que se puede identificar por su posición en la banda después de la electroforesis de la muestra de sangre. Si se examinan testigos normales al mismo tiempo que los lotes de muestras, es posible identificar las muestras que presenten un incremento manifiesto de Hb A₂ (figura 16) para lo cual hay que eluir por separado los componentes de la Hb A y de la Hb A₂; se evalúa el concentrado de Hb de cada una y se calcula la proporción de Hb A₂. El acetato de celulosa es el método preferido para efectuar la electroforesis, aunque también se puede separar la Hb A₂ mediante electroforesis en papel, si bien con este método son menos fiables la elución y medición de la Hb. El método que se describe a continuación es el recomendado por el CINH.

Equipo

1. Cámara de electroforesis y fuente de energía
2. Bandas de acetato de celulosa

3. Microdispersor (10 μ l)
4. Centrifugadora y tubos para centrifugadora
5. Pipeta de Pasteur
6. Tubos de ensayo de 16 \times 150 mm
7. Tubos de ensayo de 12 \times 75 mm
8. Fotómetro

Reactivos

1. Tri amortiguador, 0,13 M pH 9,1:
Tri (hidroximetil) metilamina 82,5 g
EDTA 7,8 g
Acido bórico 4,6 g
Agua destilada (cuanto baste para completar 5 litros)
2. Solución salina (8,5 g/l)
3. Tetracloruro de carbono

Muestra

Preparación del hemolisado:

Puede emplearse sangre con cualquier anticoagulante

1. Lavar la muestra de sangre tres veces en solución salina.
2. Lisar con 1,5 volúmenes de agua destilada y 1 volumen de tetracloruro de carbono.
3. Agitar bien durante 4-5 minutos en un tubo tapado para centrifugadora.
4. Centrifugar a 1 200-1 500 g durante 20 minutos.
5. Pipetear el lisado transparente que sobrenada en un tubo de ensayo; ajustar el contenido de hemoglobina a 100 g/l aproximadamente, agregando agua destilada (ver p. 65) para la medición de hemoglobina.

Procedimiento

1. Electroforesis

A continuación se describe el procedimiento general de la electroforesis en acetato de celulosa, aunque hay que seguir las instrucciones del fabricante en cuanto al empleo de productos específicos.

a. Verter el tri amortiguador en la cámara; mojar y colocar las mechas en la posición correcta.

b. Mojar las bandas de acetato de celulosa (de unos 5 \times 7 cm) en el tri amortiguador durante 10 minutos por lo menos.

c. Secar las bandas con dos pedazos de papel absorbente, rápida y uniformemente para eliminar el exceso de humedad.

d. Colocar las bandas secas en el aparato de electroforesis a oscuras y dejar que se estabilice durante 10 minutos.

e. Aplicar 10 μ l de lisado a cada una de las dos bandas, como una pincelada a la tercera parte de la distancia del extremo de la banda que corresponde al cátodo y a no menos de 0,5 cm de los bordes.

f. Examinar un testigo normal (y, si es posible, una preparación de referencia) para verificar el control de calidad al mismo tiempo.

g. Aplicar 200-220 V durante 100 minutos o hasta obtener una buena separación.

2. Medición

1. Sacar las bandas del tanque de electroforesis.

2. Cortar las bandas a la mitad entre las áreas de mayor concentración de Hb.

3. Para eluir la Hb, colocar las dos fracciones de Hb A₂ en un tubo de ensayo con 4 ml de tri amortiguador y las fracciones de Hb A en otro tubo a intervalos de 30 minutos.

4. Con un espectrofotómetro o colorímetro, medir la absorbancia de las dos eluciones a 413 nm. Una banda de acetato de celulosa del mismo tamaño aproximadamente se trata de la misma manera y se utiliza como blanco.

Cálculo

$$\% \text{ de Hb A}_2 = \frac{A^{\text{Hb A}_2} \times 100}{(A^{\text{Hb A}} \times 5) + A^{\text{Hb A}_2}}$$

Testigo

Preparación de referencia: se prepara con un lisado de sangre de un paciente que se sabe que tiene talasemia; contiene Hb A y Hb A₂ en una proporción fija conocida.

Significado

En adultos normales, el porcentaje de Hb A₂ es de 1,5% a 3,2%; en la β -talasemia es de 3,5% a 7%, y suele aumentar en la anemia perniciosa. Es inferior al normal en anemias ferropénicas y sideroblásticas.

Identificación electroforética de hemoglobinas anormales

Principio

La Hb A normal y las distintas hemoglobinas anormales se separan a diferentes velocidades con la electroforesis. Las posiciones relativas de las distintas hemoglobinas sobre una banda electroforética permite diferenciarlas e identificarlas de manera específica. Algunas hemoglobinas requieren condi-

ciones especiales para separarse adecuadamente (por ejemplo, diferentes tipos de amortiguador, pH y método de efectuar la electroforesis). La electroforesis en acetato de celulosa, descrita en la p. 106, es un método para diferenciar los tipos comunes de Hb en los laboratorios. Ya se han publicado las recomendaciones del CINH.

Equipo

Cámara de electroforesis y fuente de energía

Reactivo

1. Tri amortiguador, pH 8,5:

Tri (hidroximetil) metilamina	51 g
EDTA	3 g
Acido bórico	16 g
Agua destilada (cuanto baste para completar 5 litros)	

Muestra

El lisado se prepara como se indica en la p. 106.

Procedimiento

1. Preparar el tanque de electroforesis y las bandas de acetato de celulosa como se describe en la p. 105. Es conveniente emplear bandas más anchas (7 × 14 cm) si se desea examinar varias muestras en una misma banda.

2. Aplicar 20 µl de lisado en una pincelada de 2 cm, a una tercera parte de la distancia del extremo de la banda que corresponde al cátodo.

3. En partes adyacentes de la banda, aplicar en la misma forma 20 µl de una preparación de referencia normal y otra anormal (ver más adelante).

4. Aplicar 220 V durante 100 minutos o hasta obtener una buena separación.

5. Al finalizar la separación, retirar la banda del tanque con unas pinzas, secar en una estufa de aire caliente a 80-150°C durante 10-30 minutos y examinar la banda, comparando la muestra de la prueba con los testigos.

Control de calidad

Preparación de referencia: estas preparaciones se elaboran con un lisado de sangre normal y de sangre de un paciente con enfermedad causada por la Hb S. El CINH cuenta con una preparación de referencia que contiene Hb A, F, S y C.

Significado

Las hemoglobinas que se pueden identificar con facilidad son (figura 16):

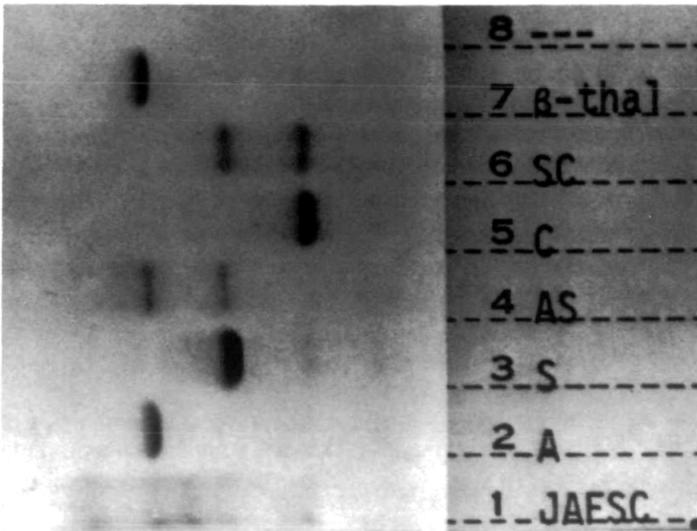


Fig. 16. Posiciones de diversas hemoglobinas después de la electroforesis en bandas de acetato de celulosa.

NOTA: En los casos hereditarios de células falciformes, el componente Hb S es menor que el Hb A; en la anemia de células falciformes, habrá Hb A si el paciente ha recibido una transfusión, pero el componente Hb S será mucho mayor que el Hb A.

Estimación de la hemoglobina F

Principio

La hemoglobina fetal es más resistente a la desnaturalización (producida por las bases fuertes) que las demás hemoglobinas. Para efectuar la prueba, se agrega una base fuerte a un hemolisado que contiene una cantidad conocida de hemoglobina; después de un tiempo determinado, se detiene la desnaturalización agregando sulfato de amonio saturado o semisaturado, dependiendo del método empleado. El sulfato de amonio hace que disminuya el pH y precipita la hemoglobina desnaturalizada; después de filtrar, se mide la hemoglobina inalterada y se expresa como porcentaje de la hemoglobina resistente a las bases (hemoglobina fetal). El método que se describe a continuación es el recomendado por el CINH y se basa en el método de Betke.

Testigos

Examinar con cada prueba: a) un hemolisado normal conocido y b) un hemolisado "anormal", que se prepara mezclando un volumen de sangre umbilical normal con nueve volúmenes de sangre adulta normal (del mismo grupo ABO), que constituye una muestra con 10% de Hb fetal.

Si es posible, incluir en la prueba una o más muestras de la preparación de referencia.

Preparación de referencia

1. Mezclar dos volúmenes de glóbulos rojos provenientes de un adulto normal, lavados en solución salina con un volumen de reactivo de cianohemoglobina y un volumen de tetracloruro de carbono.

2. Agitar durante 5 minutos; dejar reposar durante 5 minutos y centrifugar a 3 000 g durante 10 minutos.

3. Pipetear la porción inferior (es decir, el hemolisado) en un tubo limpio. Medir la concentración de Hb y ajustarla a 5 g/l diluyéndola con reactivo de cianohemoglobina.

4. Repetir este procedimiento con una muestra de sangre umbilical.

5. Mezclar los dos hemolisados de la siguiente forma:

Sangre de adulto normal:	6 ml	9 ml	9,8 ml
Sangre umbilical:	4 ml	1 ml	0,2 ml
% de Hb F en la mezcla:	40%	10%	2%

6. Almacenar a 4°C.

Las preparaciones se conservan estables durante dos o tres semanas.

Precauciones

1. Guardar el reactivo de cianohemoglobina en una botella resistente al calor de color ámbar a temperatura ambiente; permanecerá estable durante varios meses. El pH debe ser de 7,0 a 7,4 y la lectura en un fotómetro a 540 nm debe ser de cero.

2. Verificar el pH del 1,2 N NaOH mediante titulación, comparándolo con 1 N HCl con un indicador apropiado. Se necesitan 12 ml exactos de HCl para neutralizar 10 ml de 1,2 N NaOH. Guardar en una botella de plástico a temperatura ambiente.

Significado

En un niño de un año de edad, el nivel de Hb F no debe ser de más de 1%; en los adultos normales es de 0,5%-0,8%. Cantidades mayores se observan en la β -talasemia mayor, persistencia hereditaria de hemoglobina fetal (PHHF), β -talasemia hereditaria y drepanocitosis. En otros trastornos sanguíneos se observan incrementos pequeños de la Hb F.

Estimación del hierro en el suero

Principio

El método que se describe es el recomendado por el Comité Internacional para la Normalización en la Hematología; se basa en la comparación del color que aparece cuando se trata el hierro (ferroso) del suero con fenantrolina, con el que aparece en una solución normal de hierro. Primero se precipitan y separan las proteínas del suero.

Equipo

1. Fotómetro para 535 nm
2. Tubos de ensayo de 12 × 100 mm
3. Probetas
4. Pipetas volumétricas de 2 y 5 ml
5. Matraces volumétricos
6. Centrifugadora

Reactivos

1. Agente precipitante de proteínas:
Acido tricloroacético 49 g
Acido tioglicólico 14 ml
1N HCl (cuanto baste para completar 500 ml)

Este reactivo permanecerá estable durante tres o cuatro meses si se le conserva en una botella de vidrio de color ámbar a 4°C, y durante dos semanas aproximadamente si se conserva a temperatura ambiente.

2. Reactivo de fenantrolina:
Acetato de sodio (anhidro) 625 mg
Disulfato disódico de 4,7-difenil-1-10
fenantrolina ("batofenantrolina") 135 mg

Completar un volumen de 500 ml con agua destilada o deionizada.

3. Norma de hierro:

Solución base

Cloruro férrico "solución normal para absorción de átomos"; por lo común contiene 20 mmol/l Fe.

Solución normal

Diluir 2 ml de solución base en agua destilada o deionizada hasta obtener un litro de solución; por lo general contiene 40/μmol/l Fe.

4. Agua destilada o deionizada.

Preparación de los objetos de vidrio

Es de suma importancia evitar la contaminación con hierro; todos los objetos de vidrio, incluyendo las botellas de los reactivos, deben lavarse con detergente, remojar en 2N HCl durante 24 horas y enjuagarse con agua destilada o deionizada.

Muestra

El suero se obtiene de sangre venosa recolectada en un tubo que no tenga hierro (es decir, en un tubo que se haya limpiado de la manera especial descrita antes). Es imprescindible evitar que la muestra se hemolise; en caso necesario, la prueba puede efectuarse en plasma obtenido de sangre heparinizada.

Procedimiento

1. Agregar 2 ml de agente precipitante de proteínas a cada uno de los tres tubos que contienen respectivamente a) 2 ml de suero, b) 2 ml de solución normal de hierro y c) 2 ml de agua (blanco).

2. Mezclar con fuerza por lo menos durante un minuto y dejar reposar durante cinco minutos.

3. Centrifugar el tubo a) que contiene el suero para obtener un suero sobrenadante transparente.

4. Colocar 2 ml de suero sobrenadante y 2 ml de las otras dos soluciones b) y c) en diferentes tubos.

5. Agregar a cada tubo 2 ml de reactivo de fenantrolina.

6. Mezclar bien y dejar reposar durante cinco minutos.

7. Leer la absorbancia en el fotómetro a 535 nm en comparación con el blanco de agua.

Cálculo

$$\text{Hierro en el suero } (\mu\text{mol/l}) = \frac{A_{\text{suero}} - A_{\text{blanco}}}{A_{\text{norma}} - A_{\text{blanco}}} \times 40$$

(Para convertir a mg/l, multiplicar el resultado en $\mu\text{mol/l}$ por 0,56.)

Significado

La cantidad normal de hierro en el suero es de 13 a 32 $\mu\text{mol/l}$ (0,7-1,8 mg/l); es menor en las anemias ferropénicas y en las infecciones; es mayor en la talasemia, hemoglobinopatías, anemia sideroblástica y en pacientes a los que se les han administrado muchas transfusiones.

Fuentes de error

1. Contaminación con hierro de los objetos de vidrio y de los tubos en los que se recolecta la sangre.
2. Hemólisis en el suero.
3. Norma preparada sin exactitud.
4. Errores de pipeteado.
5. Mal funcionamiento del fotómetro; filtro defectuoso.

Testigos

Con cada lote se deben examinar un testigo normal y testigos anormales (alto y bajo) provenientes de un lote anterior y, si es posible, una preparación de referencia de hierro en el suero.

Capacidad total de fijación de hierro

Esta prueba, que es una estimación de la transferrina, puede ser de gran utilidad para diferenciar una deficiencia de hierro de una anemia sideroblástica, una talasemia o una anemia producida por inflamación. El CINH ha descrito un procedimiento (*British Journal of Hematology* 1978; 38:281-7) que es confiable y se puede emplear en los laboratorios clínicos; no obstante, existen dificultades técnicas que impiden su uso como método preciso de investigación o como método confiable en muchos laboratorios.

Recuento de leucocitos (glóbulos blancos)

Principio

La sangre se diluye en un líquido que lisa los eritrocitos, pero no los leucocitos ni los eritrocitos nucleados. El líquido en que se diluye la sangre también contiene un tinte que tiñe los núcleos. No todas las células que se cuentan son leucocitos, por lo que es necesario corregir el recuento si el frotis de sangre presenta eritrocitos nucleados.

Equipo

1. Hemocitómetro con rayado de Neubauer y cubreobjetos (p. 116)
2. Pipeta de 20 μ l
3. Pipeta graduada de 1 ml
4. Tubos de 75 \times 12 mm
5. Mezcladora mecánica

6. Pipetas de Pasteur
7. Microscopio

Reactivos

1. Líquido para diluir:
Acido acético glacial 2 ml
Violeta de Genciana, 1% acuosa 1 ml
Agua destilada (cuanto baste para completar 100 ml)

Muestra

Muestra de sangre venosa con EDTA o de sangre capilar.

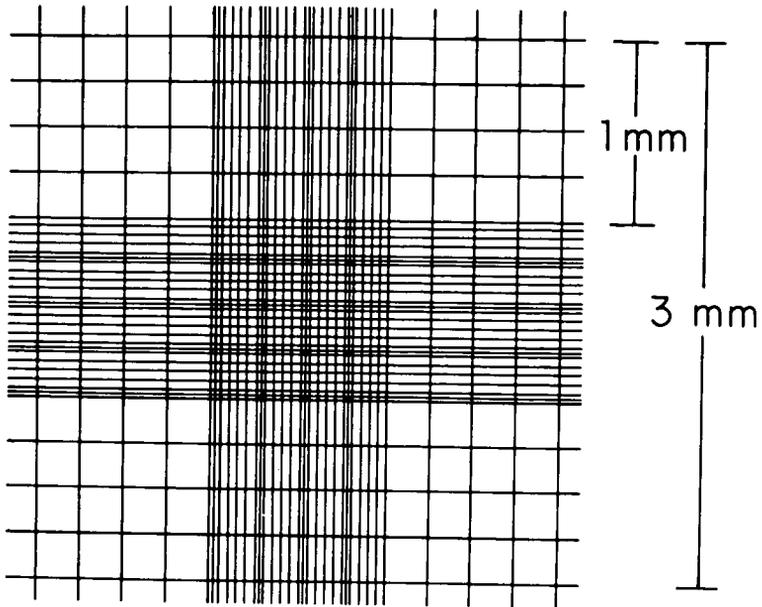
Procedimiento

1. Pipetear 0,38 ml de líquido para diluir en un tubo de ensayo.
2. Si se emplea una muestra de sangre con EDTA, mezclar bien durante un mínimo de dos minutos a mano o, de preferencia, con una mezcladora mecánica.
3. Llenar la pipeta de 20 μ l hasta la marca, y limpiar la parte exterior de la pipeta.
4. Verter el contenido del líquido para diluir y enjuagar la pipeta succionando y expeliendo el líquido en el tubo unas cuantas veces. Mezclar durante un mínimo de dos minutos a mano o, de preferencia, con una mezcladora mecánica.
5. Disponer el hemocitómetro con el cubreobjetos en la posición correcta; con una pipeta de Pasteur o un tubo capilar, tomar un poco de sangre diluida y llenar los dos lados del hemocitómetro.
6. Esperar dos minutos para que las células se estabilicen.
7. Con el objetivo 10X y poca luz, contar las células que aparecen en los cuatro cuadrados grandes de los dos lados de la cámara (ver figura 17). Cada cuadrado grande tiene un volumen de 0,1 μ l.
8. Al contar las células hay que compensar la distribución aleatoria del margen de cada cuadrado, dejando de contar las que toquen la línea interna inferior derecha.
9. Calcular el número de glóbulos blancos sobre la base de las células contadas, el área y la dilución:

$$GB/l = \frac{\text{No. de células contadas} \times \text{dilución (o sea, 20)} \times 10 \times 10^9}{\text{No. de cuadrados de 0,1 } \mu\text{l contados}}$$

10. Si el recuento es de menos de $3 \times 10^9/l$, repetir usando 40 μ l de sangre y 0,36 ml de líquido para diluir (1/10). Si el recuento es de más de 30

a.



b.

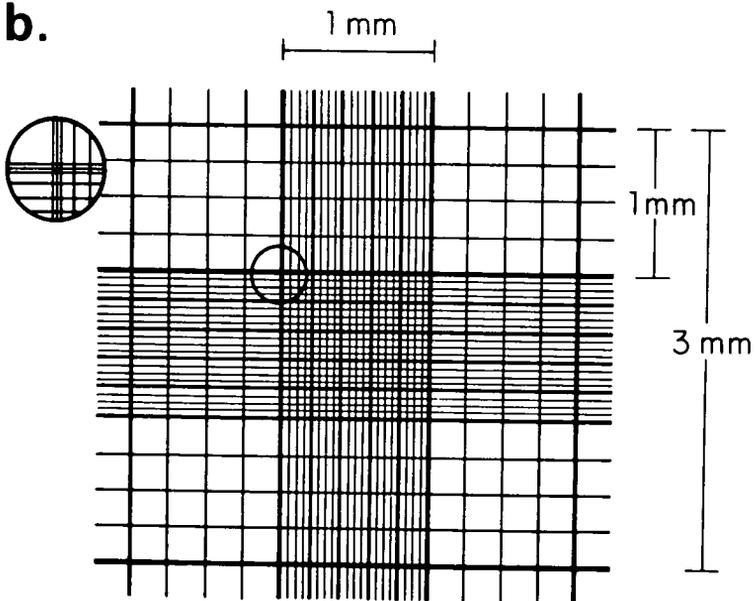


Fig. 17. Cámara de recuento del hemocitómetro—**a)** Rayado de Neubauer y **b)** rayado de Neubauer mejorado.

$\times 10^9/l$, repetir usando 20 μl de sangre y 0,78 ml de líquido para diluir (1/40).

11. Si en el extendido de sangre aparecen más de 10 eritrocitos nucleados por cada 100 leucocitos, el total de GB se debe corregir de acuerdo con la siguiente fórmula:

GB correg. = GB no correg.

$$\times \frac{100}{(\text{GR nucleados}/100 \text{ GB en el extendido}) + 100}$$

Fuentes de error

1. Errores de pipeteado o errores cometidos al utilizar una cámara de recuento del hemocitómetro como la que se describe en la p. 119.

2. Desintegración de los leucocitos cuando se deja mucho tiempo la muestra; el recuento debe hacerse en un máximo de seis horas después de tomar la muestra.

Testigos

Se preparan dos juegos de muestras de pacientes.

Empleo de material testigo

Este material se usa como se describe en la p. 47 y su empleo es esencial cuando se utiliza un contador electrónico de células, aunque también es útil como material de control de calidad para verificar el desempeño técnico con técnicas manuales y una cámara de recuento de hemocitómetro. A fin de que una preparación pueda usarse como material testigo, los glóbulos se deben fijar mediante uno de los dos métodos siguientes:

a. Fijación con acetato

Centrifugar una muestra de sangre humana fresca (con EDTA); pipetear con cuidado la capa amarillo blanquizca en otro tubo, teniendo cuidado de excluir las plaquetas. Diluir esta capa en solución salina hasta obtener una suspensión de células de $10\text{-}20 \times 10^9/l$. A continuación, diluir la suspensión aún más (1:20) con la siguiente solución fijadora:

ácido acético glacial	42 mg
sulfato de sodio	7 g
cloruro de sodio	9 g
agua destilada	(cuanto baste para completar un litro)

Este material se conserva estable durante varios meses.

b. Fijación con glutaraldehído

Los glóbulos rojos fijados con glutaraldehído sirven de sustituto estable de los glóbulos blancos si se agregan a sangre entera que no contenga leucocitos. La sangre de aves (por ejemplo, de pollos o pavos) es muy útil porque los eritrocitos son nucleados y tienen el tamaño adecuado.

1. Colocar una muestra de sangre de pollo o pavo en una quinta parte de su volumen de diluyente de ACD o CFD (ver p. 67).

2. De inmediato, lavar tres veces en una solución amortiguadora de fosfato, pH 7,4 (18 ml de 23,4 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 82 ml de 21,3 g/l Na_2HPO_4).

3. Agregar 10 volúmenes de glutaraldehído (10 ml/l de glutaraldehído al 25%) a las células aglomeradas. Después de mezclar continuamente durante una hora a temperatura ambiente, lavar tres veces en agua y luego preparar una suspensión en glicina al 12,5%. Agregar penicilina G/estreptomicina 60 mg/100 mg por dl.

4. Colocar una muestra de sangre humana de un donante que sea HB_s negativa o, por lo menos, que no tenga antecedentes de ictericia en una quinta parte de su volumen de diluyente de ACD o CFD. Centrifugar durante 10 minutos a 3 000 g; extraer la capa amarillo blancuzca tan completamente como sea posible.

5. Tomar una muestra de la suspensión de células fijadas; agitar con fuerza durante un minuto (si es posible, en una mezcladora vortex) y después agregar una cantidad adecuada a la sangre humana para obtener la preparación de referencia con glóbulos blancos en el rango de 5 a $15 \times 10^9/l$.

6. Mezclar bien en una mezcladora mecánica y verter volúmenes de 1 ml en tubos, sin dejar de mezclar.

7. Determinar el valor de los glóbulos blancos repitiendo el conteo como se describe en la p. 115. La suspensión de glóbulos blancos se conserva estable durante meses e incluso años. Sin embargo, la mezcla de sangre debe desecharse cuando se hemolisen los glóbulos rojos. La mezcla se tiene que guardar a 4°C ; al preparar la mezcla para utilizarla, el recipiente se calienta a temperatura ambiente y se agita con fuerza a mano durante tres minutos; a continuación, el contenido se mezcla en una mezcladora mecánica durante 10 minutos por lo menos.

El hemocitómetro

La cámara de recuento del hemocitómetro con rayado de Neubauer o rayado de Neubauer mejorado, está construida de manera tal que la distancia entre el lado inferior del cubreobjetos y la superficie de la cámara es de 0,1 mm (figura 18). La superficie de la cámara tiene dos áreas con un rayado especial y las dimensiones que aparecen en la figura 17. Las líneas limítrofes

del milímetro cuadrado central son dobles o triples. En las áreas centrales hay 25 cuadrados en el rayado mejorado de Neubauer y 16 en el rayado normal de Neubauer; cada uno tiene una superficie de 0,04 mm² (0,02 × 0,02 mm); estos cuadrados se subdividen a su vez en cuadrados más pequeños de 0,0025 mm² (0,05 × 0,05 mm). Los cuadrantes exteriores del área rayada son de 1 mm² y se dividen en 16 cuadrados. Para contar glóbulos blancos se emplean los cuatro cuadrantes exteriores (= 4 mm²) y para contar plaquetas se utiliza toda la cámara (= 9 mm²).

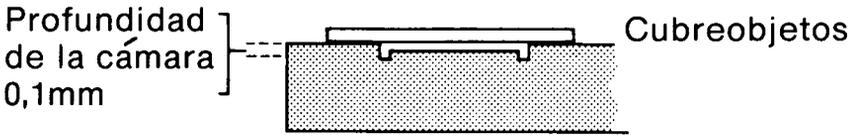


Fig. 18. Corte transversal de la cámara de recuento del hemocitómetro.

Cálculos

La fórmula para calcular el recuento de células es:

$$\text{Recuento (células/l)} = N \times \frac{D}{A} \times 10 \times 10^6$$

Donde N = No. total de células contadas

D = Dilución

A = Área total contada (en mm²)

10 = factor para convertir el área a volumen en μl

10⁶ = factor para convertir el recuento/μl al recuento/l

Fuentes de error en el conteo de células

1. Si se emplea sangre capilar hay que obtener gotas que fluyan libremente.

2. Si se emplea sangre anticoagulada, la muestra se debe mezclar con mucho cuidado invirtiendo el tubo que contiene la sangre por lo menos 20 veces, antes de tomar la muestra para la prueba. No hay que agitar el tubo porque se produce espuma que hace imposible pipetear con exactitud; es necesario inclinar el tubo en un ángulo de 45° o un poco más, y pipetear del labio del tubo siguiendo el mismo procedimiento empleado con la sangre capilar.

3. Las pipetas utilizadas para tomar las muestras deben estar limpias y secas.

4. Hay que llenar la pipeta con rapidez, usando una manguera de aspiración unida a la pipeta, hasta la marca deseada; si se pasa un poco, el exceso de sangre se puede eliminar tocando la punta de la pipeta con un papel filtro o un papel de seda; si se pasa mucho de la marca, hay que usar una nueva pipeta.

5. En la columna de sangre no debe haber burbujas de aire.

6. Hay que limpiar la parte exterior de la pipeta de cualquier resto de sangre antes de introducirla en el diluyente.

7. Después de verter el contenido de la pipeta en el diluyente, hay que enjuagar la pipeta varias veces con el mismo líquido para asegurar que toda la sangre pase al diluyente.

8. El tubo que contiene la sangre diluida se debe agitar durante un mínimo de dos minutos a mano o, de preferencia, con una agitadora mecánica. La cámara se llena inmediatamente después de agitar el tubo con una pipeta de Pasteur o una pipeta capilar.

9. La cámara se llena por acción capilar, regulando el flujo del líquido que sale de la pipeta o del tubo capilar de manera tal que la cámara se llene rápido; es necesario llenar la cámara por completo, si bien hay que tener cuidado de que el líquido no se derrame sobre los orificios. Hay que dejar que las células se establezcan en el área de conteo durante unos 2 minutos y proceder con el recuento.

10. La cámara y el cubreobjetos del hemocitómetro deben estar limpios y secos antes de usarlos, ya que pueden producirse errores graves si tienen huellas dactilares o una película de grasa.

11. Las pipetas deben tener un margen máximo de error de $\pm 1,0\%$; no se deben usar pipetas menos exactas.

12. Es necesario contar un número suficiente de células para reducir los errores causados por la distribución al azar de las células; en la práctica, hay que contar por lo menos 100 células. Otra forma de verificar la distribución correcta de las células en la cámara es que el número de células contadas en cada área (es decir, en cada cuadrado grande) no debe diferir en más de un 10%.

Recuento de plaquetas

Principio

La sangre se diluye con una sustancia que hemoliza los glóbulos rojos; se llena un hemocitómetro con el líquido diluido y se cuentan las plaquetas, de preferencia con un microscopio de contraste de fase.

Equipo

1. Cámara de recuento delgada de fondo plano (hemocitómetro de contraste de fase con rayado de Neubauer, ver más arriba).
2. Microscopio normal o, si es posible, microscopio de fase provisto de condensador de fase de larga distancia de operación.
3. Pipeta de 20 μ l.
4. Pipeta graduada de 2 ml.
5. Tubo de ensayo de 75 \times 12 mm.
6. Mezcladora mecánica.

Reactivo

1. Líquido diluyente:
Oxalato de amonio en agua destilada al 1%.
Guardar en un refrigerador y filtrar siempre justo antes de usarlo.

Muestra

Sangre venosa con EDTA o sangre capilar.

Procedimiento

1. Si la muestra de sangre se toma de la yema de un dedo, la punción tiene que estar limpia y la sangre fluir libremente; hay que limpiar la primera gota de sangre. Si la muestra de sangre se toma de una vena, hay que extraerla con una jeringa de plástico (o vidrio) y una aguja corta calibre 19 ó 20. Hay que retirar la aguja antes de transferir la sangre a un recipiente de plástico que contenga EDTA y mezclar la sangre y el anticoagulante de inmediato y con suavidad para evitar que se forme espuma.
2. Pipetear 0,38 ml de diluyente en un tubo de ensayo.
3. Llenar la pipeta de 20 μ l hasta la marca con sangre y limpiar la parte exterior de la pipeta.
4. Vaciar el contenido en el diluyente y enjuagar varias veces la pipeta con el mismo diluyente; mezclar por lo menos durante 10 minutos a mano o, de preferencia, con una mezcladora mecánica.
5. Llenar el hemocitómetro como se indica en la p. 115.
6. Cubrir la cámara con una caja de Petri durante 10–20 minutos para que las plaquetas se estabilicen, y dejar un pedazo de algodón o papel filtro húmedo en la caja para evitar la evaporación.
7. Por medio del contraste de fase, contar las plaquetas presentes en los cuadrados grandes de 1 mm (= 0,1 μ l). Contar las plaquetas en cuantos cuadrados sean necesarios para alcanzar un recuento de más o menos 100. Las plaquetas son redondas u ovaladas; su estructura interna granular y el resplan-

dor púrpura que se observa a su alrededor sirven para distinguirlas de los desechos. En el fondo se observan sombras de los glóbulos rojos lisados por el oxalato de amonio. Si no se cuenta con un microscopio de contraste de fase, se puede emplear un microscopio de luz normal, siempre y cuando el condensador se coloque boca abajo para que la intensidad de la luz sea baja.

8. Calcular el número de plaquetas por litro de sangre según la fórmula que aparece en la p. 119.

Testigos

1. Es preciso preparar dos diluciones y sacar la media de los recuentos, que deben concordar con un margen del 10%.

2. Hay que correlacionar el recuento de plaquetas obtenido en la cámara con las plaquetas que aparecen en el frotis.

Fuentes de error

1. Se prefiere sangre extraída de una vena a la sangre capilar, porque las plaquetas se adhieren a la herida y no siempre es posible reproducir diluciones sucesivas de una punción en la yema del dedo.

2. En la p. 119 se describen los errores comunes de pipeteado y hemocitometría. Además, hay que estar completamente seguro de que la cámara esté perfectamente limpia, ya que el polvo y los desechos pueden contarse como plaquetas; es necesario lavarla con agua jabonosa, enjuagar con agua destilada, dejar que seque y limpiar con un papel que no suelte pelusa; también hay que asegurarse de que la cubierta esté limpia antes de usarla.

3. La presencia de aglomeramientos de plaquetas impide efectuar un recuento fiable; por ende, si la muestra está aglomerada, es necesario descartarla y tomar una muestra fresca.

4. El diluyente de oxalato de amonio debe conservarse en refrigeración y desecharlo si presenta pruebas de contaminación bacteriana.

5. Es necesario efectuar el recuento antes de que pasen tres horas desde que fue tomada la muestra.

Velocidad de sedimentación de eritrocitos

Principio

La velocidad de sedimentación de eritrocitos (VSE) mide la velocidad de sedimentación de los glóbulos rojos en el plasma; el valor numérico en milímetros se obtiene midiendo la distancia que hay entre el punto más bajo del menisco de la superficie y el límite superior del sedimento de glóbulos

rojos en una columna de sangre anticoagulada y diluida, que ha permanecido en el tubo de sedimentación durante 60 minutos. El método que se describe a continuación se basa en el método de Westergren y ha sido recomendado por el CINH como método normal seleccionado.

Equipo

1. Tubos de Westergren que satisfagan las normas recomendadas por el CINH.
2. Soporte para el tubo de sedimentación.

Reactivo

Solución anticoagulante y diluyente de citrato de sodio dihidrato:

$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 32,08 g

H_2O destilada (cuanto baste para completar 1 litro)

Filtrar a través de una membrana estéril con un diámetro máximo de orificio de 0,22 μm en un recipiente esterilizado. No agregar conservadores; mantener en refrigeración; debe conservarse en buen estado durante varios meses, pero hay que desecharlo si se torna turbio.

Muestra

Muestra de sangre venosa; agregar cuatro volúmenes de sangre a un volumen de anticoagulante y diluyente. Asimismo, se puede usar sangre anticoagulada con EDTA sólido (1,5 mg/ml), aunque justo antes de comenzar la prueba es necesario diluirla a razón de cuatro volúmenes de sangre.

Procedimiento

1. Llenar un tubo de Westergren normal limpio y seco con la sangre y ajustar el nivel a la marca "0".
2. Colocar el tubo en posición completamente vertical sobre la mesa, en un lugar donde no quede expuesto a la luz directa del sol y donde no haya vibraciones ni corrientes de aire.
3. Después de una hora exactamente, medir la distancia en milímetros que hay desde la parte inferior del menisco de la superficie hasta la parte superior de la columna de glóbulos rojos que se sedimentan (en la que es evidente toda la densidad) y registrarla como el valor de VSE (por ejemplo, VSE = 26 mm en una hora).

Testigos

Hasta el momento no se cuenta con ninguno, salvo una buena técnica.

Fuentes de error

1. Si la muestra se conserva a temperatura ambiente, hay que efectuar la prueba antes de que transcurran dos horas; si se conserva a 4°C, antes de seis horas; la sangre con EDTA se puede usar hasta 24 horas después si se mantiene a 4°C.

2. La VSE depende de la temperatura ambiente en la que se lleve a cabo la prueba; las cifras normales que se citan corresponden a 18–25°C, pero si la temperatura ambiente es más alta, es preciso establecer otro rango normal de temperaturas.

3. Al hacer la punción de la vena hay que evitar la contaminación con los materiales empleados para limpiar la piel.

4. Cualquier coágulo en la sangre invalidará la prueba.

5. Hay que prestar gran atención a la dilución y mezcla de la muestra.

6. Los tubos de vidrio se deben limpiar en un sistema de acetona y agua (lavar en agua, luego en alcohol y por último en acetona); también es posible enjuagarlos en agua y dejarlos escurrir y secar durante toda la noche. No se recomienda el empleo de mezclas de dicromato y detergente.

7. El tubo debe estar en posición completamente vertical.

Detección de sangre oculta en heces

Principio

En esta reacción se oxida la aminofenazona para obtener un color azul.

Equipo

1. Centrifugadora
2. Tubos para centrifugadora
3. Cilindro de medición
4. Tubos de ensayo de 12 × 100 mm

Reactivos

1. Peróxido de hidrógeno, solución fresca 10 vol.
2. Acido acético al 10%
3. Alcohol 95%
4. Aminofenazona, cristalina

Procedimiento

1. Colocar cerca de 0,13 g de aminofenazona en el fondo de un tubo de ensayo y agregar 5 ml de alcohol 95%.

2. Colocar una pequeña cantidad de heces en un tubo para centrifugadora.
3. Agregar 7 ml de agua destilada y mezclar bien con un agitador de vidrio.
4. Centrifugar durante cinco minutos a 1 500 rpm (1 200 g) y decantar lo que sobrenade en un tubo de ensayo.
5. Verter con cuidado encima del sobrenadante 10 gotas de ácido acético al 10% y 5 ml de la solución de aminofenazona (descrita en el paso 1). No mezclar.
6. Agregar 10 gotas de la solución de 10 vol. de peróxido de hidrógeno. No mezclar y dejar reposar durante un minuto.
7. Observar la aparición de un color azul entre las dos capas de líquido:

Azul pálido = reacción positiva (+)

Azul oscuro = reacción muy positiva (++)

Azul negro = reacción positiva muy fuerte (+++)

Ningún cambio de color = negativa

Testigos

1. Testigo negativo con agua destilada.
2. Testigo positivo con agua que contiene 1% de sangre.
3. Mezclar una gota de sangre en una pequeña cantidad de heces y repetir la prueba con esta muestra.

Precauciones

1. El día anterior a la prueba, el paciente no debe comer carne ni limpiarse los dientes con fuerza.
2. Todos los objetos de vidrio deben estar limpios como se indica en la p. 124, No. 6.
3. El muestreo aleatorio de las heces suele dar resultados negativos falsos; para evitarlo, hay que tomar varias muestras de distintas partes del espécimen o hay que hacer una emulsión de todo el espécimen antes de muestrearlo.
4. Es necesario repetir la prueba tres días seguidos antes de emitir un informe de un resultado negativo.

NOTA: Existen diversos estuches y métodos de “papel filtro” para examinar las pruebas de sangre en heces; son tan confiables como el método antes descrito y exigen las mismas precauciones.

Glosario de abreviaturas

- ACD—ácido citrato dextrosa
ADN—ácido desoxirribonucleico
ARN—ácido ribonucleico
CFD—citrato fosfato dextrosa
CHCM—concentración de hemoglobina corpuscular media
CINH—Comité Internacional para la Normalización en la Hematología
CV—coeficiente de variación
DE—desviación estándar
EDTA—ácido etilendiaminotetracético
GB—glóbulo blanco
GR—glóbulo rojo
G6F—glucosa-6-fosfato
G6FD—glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GSSG—glutatión oxidado
Hb—hemoglobina
HbO₂—oxihemoglobina
HCM—hemoglobina corpuscular media
HiCN—cianoemoglobina
HNP—hemoglobinuria paroxística nocturna
Hto—hematócrito
IgG—inmunoglobulina G
NADP—fosfato de nicotinadenindinucleótido (ver también TPN)
NADPH—NADP reducido (ver también TPNH)
OMS—Organización Mundial de la Salud
PHHF—persistencia hereditaria de hemoglobina fetal
PMN—leucocitos polimorfonucleares
rpm—revoluciones por minuto
TPN—igual que NADP
TPNH—igual que NADPH
UV—ultra violeta
VCM—volumen corpuscular medio
VSE—velocidad de sedimentación de los eritrocitos

Material didáctico

1. Se pueden obtener transparencias en color (35 mm) de las microfotografías No. 1-48, ya sea por separado o en juegos; también se cuenta con transparencias en blanco y negro (35 mm) de algunas de las figuras que aparecen en el texto.
2. Se pueden obtener impresiones en color, (8" × 10") de las microfotografías No. 1-48, ya sea por separado o en juegos de dos.
3. Daland GA. *Color Atlas of Morphologic Hematology*. Se cuenta con transparencias (35 mm) e impresiones (8" × 10") en color, de las ilustraciones de los extendidos de sangre que constituyen este magnífico atlas.
4. McArthur JR. *American Society of Hematology Slide Bank Teaching Sets*:
 - a. A-1 Colección de morfología. Transparencias de 35 mm/microficha en color.
 - b. B-1 y B-2: *Morfología de sangre anormal y de médula*. Transparencias de 35 mm/microficha en color.
 - c. B-4: *Introducción a la morfología sanguínea*. Manual/transparencias/microficha.
 - d. B-6, R-3, R-5, R-6, R-7, B-14: Impresiones didácticas en color (8" × 10") que contienen 24 microfotografías de hematopoyesis y diversos tipos de anemia.
 - e. R-1: Hillman RS. *Clinical Diagnosis of Anemia*. Cinta/transparencias o cinta/microficha.
 - f. R-2: Adamson J. *Introduction to Clinical Hematology*. Cinta/transparencias o cinta/microficha.
 - g. B-7: Wintrobe MM. Transparencias en color de *Clinical Hematology*.

Para mayor información, escribir a:

American Society of Hematology Slide Bank
Health Sciences Learning Resources Center
Mail Stop SB-56
University of Washington
Seattle, Washington 98195
U S A

Índice analítico

- Acantocitos, 9, 10, 24
Aguja de trefina, 87
Aguja Jamshidi-Swaim, 87
Aguja Klima, 86
Aguja Salah, 86
Aminofenazona, 124
Anemia:
 aplástica, 10, 12, 87
 de cuerpos de Heinz, 97
 diseritropoyética, 12
 diseritropoyética congénita, 17
 falciforme, 1, 14
 ferropénica, 1, 2, 6, 13, 20, 26, 30, 31, 32
 hemolítica, 7, 27, 32, 34, 79, 92
 hemolítica autoinmune, 34, 95
 hemolítica microangiopática, 35
 hipocrómica, 6, 20, 31, 32
 macrocítica, 2, 15
 megaloblástica, 3, 7, 15, 16, 17, 18, 19, 29, 34
 microcítica, 2, 15
 microcítica hipocrómica, 20, 32
 mieloptísica, 38
 normocítica, 2, 33, 34
 nutricional, 10, 13, 41
 perniciosa, 17, 26
 perniciosa juvenil, 26
 por deficiencia de ácido fólico, 3, 6
 por deficiencia enzimática de los glóbulos rojos, 2
 por deficiencia de vitamina B₁₂, 1, 3, 6
 por hemoglobinopatías, 1, 2
 por infección, 12
 por infecciones bacterianas, 2
 por infecciones crónicas, 32, 38
 por inflamación, 114
 por inflamación crónica, 30
 por pérdida de sangre, 31
 por protozoarios, 1, 2
 sideroblástica, 6, 12, 21, 22, 26, 29, 32, 89, 90, 107, 113, 114
 talasemia, 1, 3, 7
Anisocitosis, 9, 20, 24, 26, 38
Anti IgA, 96
Anticuerpos drogas-antidrogas, 95
Azul de metileno, 100
Azul de metileno nuevo, 79
Basofilia punteada, 25
β-talasemia, 26, 27, 89, 97, 107, 111
Bilirrubina en el suero, 7
Biopsia con trefina, 87, 88
Borrelia, 9
Calibración del espectrofotómetro, 60
Carboxihemoglobina, 69
Células falciformes de la, 104
Células "blanco", 9, 10, 21, 22, 24, 27
Células del plasma, 87
Células espinosas, 9, 10, 25, 35
Células falciformes, 9, 10, 24, 27
 carácter hereditario de, 109
 enfermedad de, 109
 hemoglobina de, 104
Células hemopoyéticas, 87
Células malignas, 87
Células reticuloendoteliales, 90
Células sensibilizadas a la IgG, 94
Células sensibilizadas al complemento, 94
Células yelmo, 35
Coeficiente de variación (CV), 49
Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), 35
Control de calidad, 3, 41, 45, 48
Cuerpos anulares de Cabot, 10, 26
Cuerpos de Heinz, 10, 28, 30, 78, 80
Cuerpos de Howell-Jolly, 9, 10, 16, 25, 28
Cuerpos de inclusión, 96, 97
Curva de Gauss, 47, 48
Deficiencia de ácido fólico, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 42
Deficiencia de vitamina B₁₂, 15, 16, 18, 19, 20, 42
Desviación estándar (DE), 43, 46, 47, 48, 49, 50, 53
Diphyllobotrium latum, 17
Disglobulinemia, 105
Ditionito, 104
Eliptocitos, 10
Enfermedad del hígado, 16, 17
Equinocitos, 25
Eritrocitos, 80, 102
Eritrocitos desviados, 6, 21, 22
Eritropoyesis, 56

- Esferocitos, 9, 24, 35, 36
 Esferocitosis, 27, 34, 35, 36
 Espiroquetas, 9
 Esplenectomía, 80, 97
 Espíruce, 17
 Esquistocitos, 9, 10, 25, 35
 Evaluación externa de la calidad, 45, 53
 Exactitud, 45, 46, 52, 53
 Extendido de sangre, 35, 38, 63, 79, 80, 81, 82
 Extendidos espesos, 83
 Extracción de sangre, 61
- Formas elípticas, 21
 Frotis de sangre, 36, 54
 Frotis de sangre periférica (extendido) 8, 13, 15, 20, 34, 35
 Función del hígado, 15, 16
- Globulina antihumana, 93, 94
 Glóbulos blancos, 68, 91, 115, 118
 Glóbulos rojos, 6, 62, 76, 91
 Glóbulos rojos macrocíticos, 6, 9, 10, 15, 16, 23
 Glóbulos rojos microcíticos, 6, 9, 10, 23
 Glóbulos rojos normocíticos, 9
 Glóbulos rojos nucleados, 6, 9
 Glóbulos rojos policromatófilos, 6, 16, 33
 Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, 35, 98, 99, 100
 Gráfica de calibración, 58, 59, 66
 Gráfica de control, 50
 Granulocito, 38
 Granuloma, 87
- Hematócrito, 11, 72
 Hematuria, 91
 Hemocitómetro, 114, 116, 118, 120, 121
 Hemoglobina, 1, 2, 5, 6, 7, 10, 18, 20, 21, 30, 36, 37, 59, 65, 67, 69, 70, 72, 78, 110
 electroforesis de la, 32, 106, 107, 108
 inclusiones de la, 97
 pruebas de solubilidad de la, 104
 tipos:
 Hb A, 32, 105, 107, 108, 109
 Hb A₂, 32, 37, 105, 107
 Hb C, 36, 37, 105, 108
 Hb D, 105
 Hb F, 32, 105, 108, 109, 111
 Hb G, 105
 Hb H, 32
 HbO₂ (oxi), 8, 68, 69, 70, 91
 Hb S, 36, 101, 109
- Hemoglobina corpuscular media (HCM), 35
 Hemoglobina fetal, 109, 110, 111
- Hemoglobinometría, 57
 Hemoglobinómetro de Sahli, 71
 Hemoglobinómetro de Spencer, 72
 Hemoglobinopatías, 21, 31
 Hemoglobinuria, 91, 92
 Hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), 92
 Hemólisis, 9, 28, 34, 35, 36, 92, 99
 Hemólisis intravascular, 92
 Hemosiderinuria, 92
 Hepatitis, 61, 62
 Hierro, 42
 capacidad de fijación del, 8, 32, 114
 condición del, 2
 deficiencia de, 16, 19, 21, 39
 en el suero, 8, 13, 32, 112, 113, 114
 metabolismo del, 20
 que se puede teñir, 88
- Hiperplasia eritroide, 37
 Hipocromasia, 20
 Hipocromía, 20
- Ictericia, 14
 Infección, 19
- Larvas de filaria, 8
 Leucemia, 12, 28, 30, 33
 Leucocito, 38, 62, 63
 Leucopenia, 16
 Linfocitosis, 28
 Líquido de Helly, 87
- Mala absorción, 17
 Mastocito, 87
 Material de referencia, 46, 52
 Material testigo, 117
 Médula ósea, 11, 13, 28, 31, 33, 28, 84
 aguja, 85, 86
 aspiración, 84, 85
 biopsia, 87, 88
 examen, 31, 84
 frotis, 54
- Megacariocito, 12, 87
 Metahemalbúmina, 90, 91
 Metahemoglobina, 67, 92, 100
 Metamielocito, 18
 Método de Betke, 109
 Método de Sahli, 70
 Método de suma acumulativa, 50, 51
 Método de Tallquist, 70
 Método de Westergren, 123
 Método de la cianohemoglobina (HiCN), 7, 8, 41, 57, 65, 66, 67, 110
- Microcitosis, 20
 Microesferocito, 10, 35, 36

Microhematócrito, 73
 Mieloblasto, 28
 Mielofibrosis, 12, 27, 87
 Mieloma múltiple, 12
 Mitosis, 29

 Neutrofilia, 28
 Normoblasto, 25, 29, 90

 Osteoblasto, 87
 Osteoclasto, 87
 Ovalocito, 10, 26

 Paludismo, 2, 9, 28, 35, 81, 83
 Parásitos, 14, 17
 Plaquetas, 23, 28, 75, 77, 80, 83
 Poiquilocitosis, 9, 20, 24, 26, 38
 Policitemia, 105
 Policromasia, 10
 Policromatofilia desviada, 27
 Precisión, 45, 46, 52, 53
 Preparación de referencia, 46, 66
 Proceso hemolítico, 14, 16
 Pronormoblasto, 5
 Prueba con azul de cresilo brillante, 96, 97
 Prueba de Coombs, 34, 36, 93
 Prueba de lisis de la sucrosa, 92
 Prueba de Schumm, 90
 Punteado, 16

 Reacción del azul de Prusia, 89
 Reactivo de fenantrolina, 112, 113
 Recuento de glóbulos blancos (GB), 7, 54
 Recuento de leucocitos (GB), 82, 114
 Recuento de plaquetas, 7, 22, 54, 63, 119, 120
 Reducción del metabisulfito de sodio, 101, 102
 Reticulocitos, 5, 6, 9, 10, 19, 20, 31, 33, 38, 78, 79, 80

 macrocíticos, 6
 policromatófilos, 5
 recuento de, 8, 9, 10, 13, 19, 22, 33, 78, 79, 95
 tinción de, 30
 Reticulocitosis, 16, 32
 Rollos (Roleaux), 25, 28

 Sangre oculta, 124, 125
 Sangre umbilical, 111
 Sideroblasto, 90
 Sideroblasto anillado, 29, 90
 Siderocito, 10, 80, 90
 Suero antiglobulina, 95

 Tactoides, 104
 Talasemia, 13, 14, 21, 26, 30, 31, 32, 36, 90, 114
 Talasemia alfa y beta, 32
 Tinción de Leishman, 80
 Tinción de May Grunwald Giemsa, 80
 Tinción de Romanowsky, 80
 Tinción de Wright, 80, 84
 Transferrina, 32, 114
 Tripanosomas, 8
 Trombocitopenia, 16, 19, 54
 Tubos de Wintrobe, 76, 77
 Tumor, 12, 34

 Uncinaria, 31

 Valores de referencia, 43
 Valores normales, 42
 Velocidad de sedimentación, 63
 Velocidad de sedimentación de los eritrocitos, 122, 123, 124
 Venipuntura, 61
 Volumen corpuscular medio (VCM), 35

ISBN 92 75 71012 0

