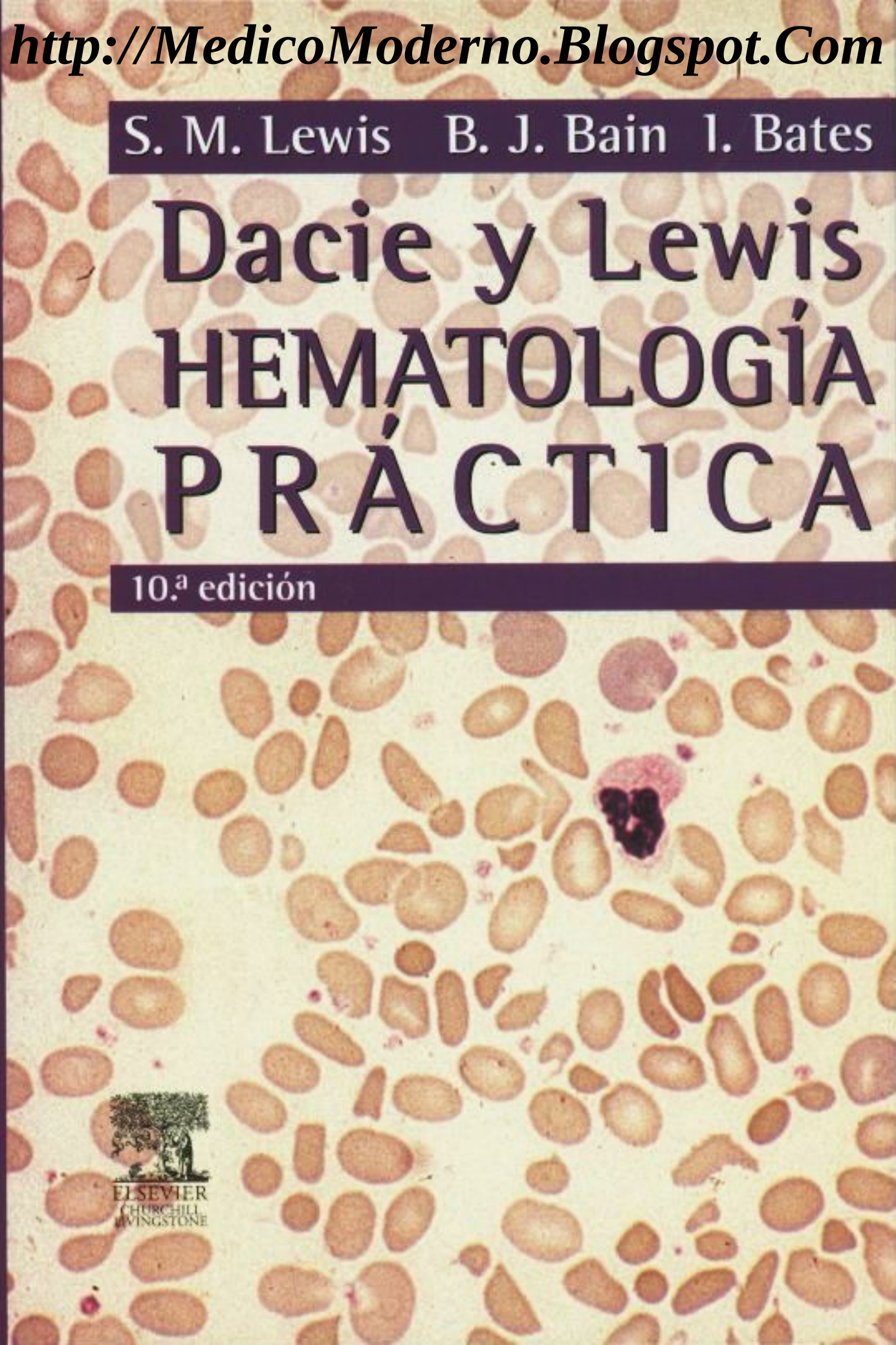
http://MedicoModerno.Blogspot.Com

S. M. Lewis B. J. Bain I. Bates

Dacie y Lewis HEMATOLOGÍA PRÁCTICA

10.ª edición



ELSEVIER
CHURCHILL
LIVINGSTONE



Edición en español de la 10.ª edición de la obra original en inglés
Dacie and Lewis. Practical Haematology

Copyright © MMVI, Elsevier Ltd.

Traducción
Pedro L. Donado Pintado
Médico

Revisión científica
Jordi Juncà i Piera
Doctor en Medicina, Especialista en Hematología;
Jefe de Sección, Laboratorio de Hematología,
Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona (Barcelona)

© 2008 Elsevier España, S.A.
Infanta Mercedes, 90, 7.ª planta - 28020 Madrid, España

Fotocopiar es un delito (Art. 270 C.P.)
Para que existan libros es necesario el trabajo de un importante colectivo (autores, traductores, dibujantes, correctores, impresores, editores...). El principal beneficiario de ese esfuerzo es el lector que aprovecha su contenido.
Quien fotocopia un libro, en las circunstancias previstas por la ley, delinque y contribuye a la «no» existencia de nuevas ediciones. Además, a corto plazo, encarece el precio de las ya existentes.
Este libro está legalmente protegido por los derechos de propiedad intelectual. Cualquier uso fuera de los límites establecidos por la legislación vigente, sin el consentimiento del editor, es ilegal. Esto se aplica en particular a la reproducción, fotocopia, traducción, grabación o cualquier otro sistema de recuperación de almacenaje de información.

ISBN edición original: 978-0-443-06660-3
ISBN edición española: 978-84-8086-229-5

Depósito Legal: BI. 2497 - 2007
Composición y compaginación: Fotoletra, S. A.
Impreso en España por Grafo, S.A.

Advertencia

La medicina es un área en constante evolución. Aunque deben seguirse unas precauciones de seguridad estándar, a medida que aumenten nuestros conocimientos gracias a la investigación básica y clínica habrá que introducir cambios en los tratamientos y en los fármacos. En consecuencia, se recomienda a los lectores que analicen los últimos datos aportados por los fabricantes sobre cada fármaco para comprobar la dosis recomendada, la vía y duración de la administración y las contraindicaciones. Es responsabilidad ineludible del médico determinar las dosis y el tratamiento más indicado para cada paciente, en función de su experiencia y del conocimiento de cada caso concreto. Ni los editores ni los directores asumen responsabilidad alguna por los daños que pudieran generarse a personas o propiedades como consecuencia del contenido de esta obra.

El Editor

Autores

Barbara J. Bain, FRACP, FRCPath
Imperial College Faculty of Medicine
St. Mary's Hospital
Londres, Reino Unido

Imelda Bates, MD, FRCP, FRCPath
Liverpool School of Tropical Medicine
University of Liverpool
Liverpool, Reino Unido

Sheena Blackmore CSci, FIBMS
Department of Haematology
Good Hope Hospital NHS Trust
Birmingham, Reino Unido

Anne Bradshaw, BSc, FIBMS, DMLM
Department of Haematology
Hammersmith Hospital
Londres, Reino Unido

Daniel Catovsky, FRCP, FRCPath, DSc, FMedSci
Royal Marsden Hospital
The Institute of Cancer Research
Londres, Reino Unido

Barbara De la Salle, MSc, CSci, FIBMS
UK NEQAS (H)
Watford General Hospital
Watford, Reino Unido

Inderjeet Dokal, MD, FRCP, FRCPath
Department of Haematology
Imperial College Faculty of Medicine
Hammersmith Hospital
Londres, Reino Unido

Malcolm Hamilton, MRCP, FRCPath
Haematology Department
Good Hope Hospital
Sutton Coldfield, Reino Unido

Jaspal Kaeda, PhD, FIBMS, GiBiol
Department of Haematology
Hammersmith Hospital
Londres, Reino Unido

Sue Knowles, BSc, MB, FRCP, FRCPath
Department of Haematology
St. Helier's Hospital
Carshalton, Surrey, Reino Unido

Mike Laffan, DM, FRCP, FRCPath
Department of Haematology
Imperial College Faculty of Medicine
Hammersmith Hospital
Londres, Reino Unido

Mark D. Layton, FRCP, FRCPCH
Department of Haematology
Imperial College Faculty of Medicine
Hammersmith Hospital
Londres, Reino Unido

S. Mitchell Lewis, BSc, MD, FRCPath, DCP, FIBMS
Department of Haematology
Imperial College School of Medicine
Hammersmith Hospital
Londres, Reino Unido

Richard Manning, BSc, FIBMS
Department of Haematology
Hammersmith Hospital
Londres, Reino Unido

Estella Matutes, MD, PhD, FRCPath
Royal Marsden Hospital
The Institute of Cancer Research
Londres, Reino Unido

Barry Mendelow, MD
Department of Haematology
University of Witwatersrand
Johannesburg, Sudáfrica

Clare Milkins, BSc, CSci, FIBMS
UK NEQAS (BGS)
Watford General Hospital
Watford, Reino Unido

Ricardo Morilla, MSc
Royal Marsden Hospital
Department of Academic Haematology
Londres, Reino Unido

Fiona Regan, MRCP, MRCPath
Department of Haematology
Hammersmith Hospital
Londres, Reino Unido

David Roper, FIBMS, MSc
Department of Haematology
Hammersmith Hospital
Londres, Reino Unido

Megan Rowley, FRCP, FRCPath
Department of Haematology
Kingston Hospital
Kingston, Reino Unido

David Swirsky, FRCP, MRCPath
Department of Haematology
Leeds General Infirmary
Leeds, Reino Unido

Noriyuki Tatsumi, MD, PhD
International Buddhist University
Osaka, Japan

Tom Vulliamy, BA, PhD
Department of Haematology
Hammersmith Hospital
Londres, Reino Unido

Barbara Wild, PhD, FIBMS
Department of Haematology
King's College Hospital
Londres, Reino Unido

Nay Win, FRCP, FRCPath
Red Cell Immunohaematology
National Blood Service: Tooting Centre
Londres, Reino Unido

Mark Worwood, BSc, PhD, FRCPath, FMed Sci
Department of Haematology
Cardiff University School of Medicine
Heath Park, Cardiff, Reino Unido

Prefacio

Esta 10.ª edición celebra el 55 aniversario de *Hematología Práctica*. Tanto la primera edición de J.V. Dacie de 1950 como las sucesivas ediciones con Mitchell Lewis como coautor se basaron en el curso de hematología para el London University Diploma of Clinical Pathology (DCP) y posteriormente en la licenciatura en Hematología en la entonces llamada Royal Postgraduate Medical School.

La ciencia médica ha crecido de forma exponencial en el último medio siglo; sin embargo, ninguna disciplina se ha expandido más que la hematología, tanto en sus aspectos clínicos como de laboratorio. Inicialmente, la hematología de laboratorio se restringía casi al «recuento sanguíneo» con una cámara de recuento y un microscopio. El recuento sanguíneo sigue siendo una prueba esencial porque proporciona un componente importante para el diagnóstico y el tratamiento del paciente; sin embargo, los instrumentos automáticos actuales analizan las propiedades fisicoquímicas de las células sanguíneas individuales y ofrecen datos metrológicos precisos sobre los eritrocitos, los leucocitos y las plaquetas a una velocidad inimaginable en aquellos primeros tiempos. La sofisticada tecnología permite que los análisis más complejos sean realizados de forma rutinaria en muchos laboratorios; entre ellos se incluyen los estudios de ADN, el inmunofenotipado para la clasificación de las leucemias, el diagnóstico de las anemias megaloblásticas y las mediciones con radioisótopos. No obstante, tenemos que admitir que no todos los laboratorios disponen de las pruebas más sofisticadas y dedicamos un capítulo a las pruebas esenciales en los laboratorios con pocos recursos y en los centros de salud. También tenemos en cuenta el uso creciente de los dispositivos listos para su uso, comercialmente disponibles, para muchas pruebas de laboratorio, y la tendencia a la realización de algunas de estas pruebas en el punto de asistencia; aportamos sugerencias sobre el papel de soporte del laboratorio para garantizar la fiabilidad de esta última práctica.

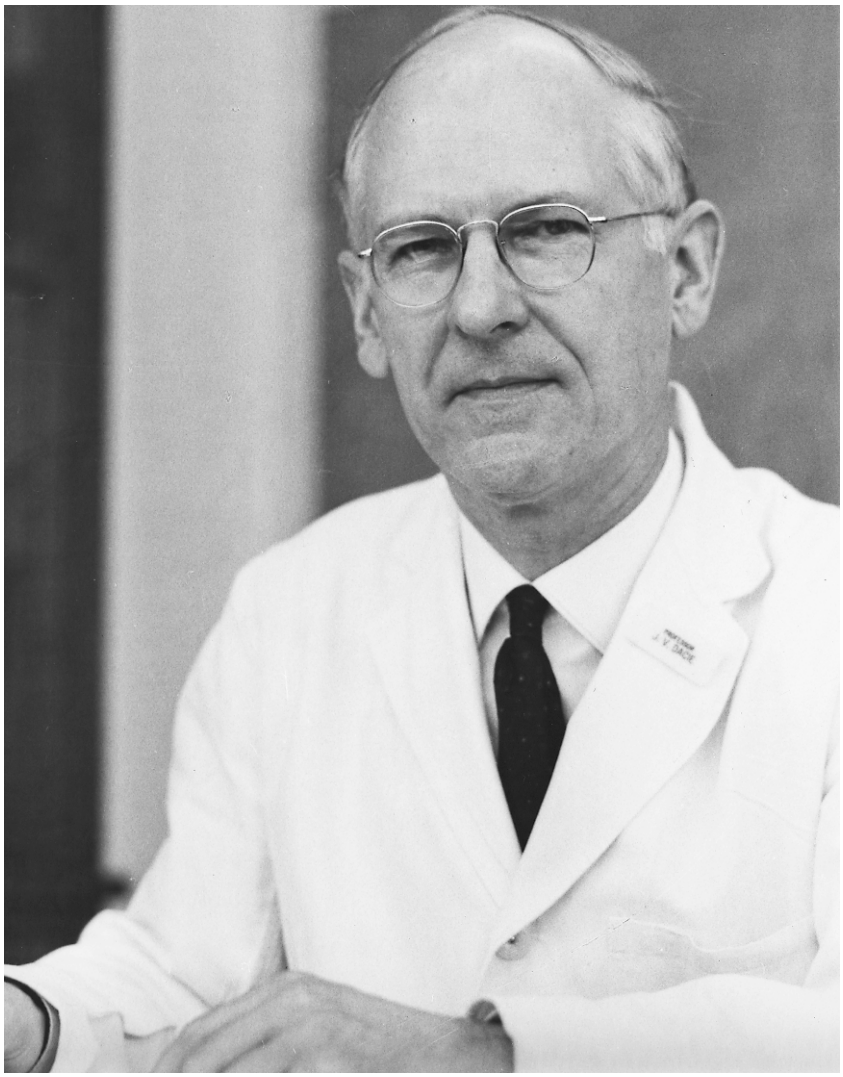
Otro avance de enorme impacto es Internet, mediante el cual se puede localizar cualquier tema, a menudo con una abrumadora cantidad de información, a partir de una sola palabra clave. Indicamos unos cuantos sitios de Internet que son importantes para la hematología, incluyendo los de los fabricantes de dispositivos y reactivos especializados.

Los científicos biomédicos son, cada vez más, los responsables del trabajo de laboratorio, de la misma forma que los hematólogos, médicamente cualificados, están más implicados en la asistencia clínica a los pacientes. Sin embargo, ambos grupos deben ser conscientes de la importancia de la organización y la dirección eficaz de un laboratorio, de la necesidad de mantener unos estándares técnicos elevados con controles de calidad bien establecidos y del conocimiento de la importancia clínica de las investigaciones hematológicas. Los principios de buena práctica de laboratorio los estableció Dacie en su 1.ª edición, cuando escribió: «Todos aquellos implicados en el trabajo de laboratorio deben comprender cuál es la importancia de las pruebas que realizan, el valor relativo de las investigaciones hematológicas y el orden en que deben emprenderse». Hemos intentado mantener su enfoque por lo que hace al contexto y al estilo, si bien actualizado para satisfacer la práctica actual.

Deseamos expresar nuestro agradecimiento a todos nuestros colaboradores, y también a otros colegas que nos facilitaron consejo experto en temas específicos; entre ellos debemos mencionar especialmente a Michel Deenmamode (Radioisótopos), Mark Griffin (Salud y seguridad), Julia Howard (Citogenética), John Meek (Química clínica), Andrew Osei-Bimpong (Hematología general).

Como especial homenaje con ocasión del 55 aniversario, esta edición está dedicada a Sir John Dacie, a sus estudiantes de diversos países, cuyas posteriores y distinguidas carreras se inspiraron en él, y al centro que él mismo fundó en la antigua Royal Postgraduate Medical School de la Universidad de Londres, actualmente Faculty of Medicine of Imperial College at Hammersmith Hospital.

S. Mitchell Lewis
Barbara J. Bain
Imelda Bates



Sir John V Dacie, MD, FRCPath, FRS
1912–2005

Abreviaturas

ACD	ácido citrato dextrosa
AcMc, AcMo	anticuerpo monoclonal
ACRES	sitio de amplificación creado por enzimas de restricción (del inglés, *amplification created restriction enzyme site*)
ADA	adenosindesaminasa
ADE	amplitud de la distribución eritrocitaria
ADH	amplitud de distribución de la hemoglobina
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADP	adenosindifosfato
AET	2-aminoetil-iso-tiouronio
AHA	anemia hemolítica autoinmunitaria
ANAE	alfa naftil acetato esterasa
ANB	alfa naftil butirato
AP	activador del plasminógeno
APAAP	fosfatasa alcalina anti-fosfatasa alcalina (del inglés, *alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase*)
ARN	ácido ribonucleico
ASB	albúmina de suero bovino
ASOH	hibridación de oligonucleótidos específicos de alelos (del inglés, *allele-specific oligonucleotide hybridization*)
AT	antitrombina
ATP	adenosintrifosfato
BCSH	Comité británico de normalización en hematología (del inglés, British Committee for Standards in Haematology)
C	complemento
C3, C3d, C3sg	componentes del complemento
CAE	naftol AS-D cloroacetato esterasa
CD	cúmulo de diferenciación
CFA	capacidad de fijación del anticuerpo
CHAD	enfermedad por hemoaglutinina fría (del inglés, *cold haemagglutinin disease*)
CHCM	concentración de hemoglobina corpuscular media
Cp	citoplasmático
CPD	citrato-fosfato-dextrosa
CTP	citosintrifosfato
CV	coeficiente de variación
DAB	diaminobenzidina
DE	desviación estándar
DMSO	dimetilsulfóxido
2,3 DPG	2,3-difosfoglicerato
DTT	ditiotreitol
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGIL	Grupo europeo para la clasificación inmunológica de las leucemias (del inglés, *European Group for the Immunological Classification of Leukaemias*)
ELISA	análisis de inmunoabsorción ligada a enzimas
EN	eritrocito nucleado
ENE	esterasa no específica
ER	enzima de restricción
FAB	francés-americano-británico (clasificación)
FAG	fosfatasa alcalina granulocítica
FE	ficoeritrina
FSc	dispersión de la luz hacia delante (del inglés, *forward light scatter*)
FVL	factor V de Leiden
g	gramos o fuerza centrífuga relativa, según contexto
G6PD	glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GPI	glucosilfosfatidilinositol
Hb	hemoglobina o concentración de hemoglobina
HbCO	carboxihemoglobina
HCM	hemoglobina corpuscular media
HEMPAS	multinuclearidad eritroblástica hereditaria con prueba del suero acidificado positiva (del inglés, *hereditary erythroblastic multinuclearity with positive acidified-serum test*)
Hi	metahemoglobina
HiCN	cianometahemoglobina
HPF	hemoglobinuria paroxística por frío
HPLC	cromatografía en fase líquida de alta resolución (del inglés, *high performance liquid chromatography*)
HPN	hemoglobinuria paroxística nocturna
Hto	hematocrito
ICSH	Comité internacional para la normalización en hematología (del inglés, *International Council for Standardization in Haematology*)
IDR	inmunodifusión radial

IEF	enfoque isoeléctrico (del inglés, *isoelectric focusing*)
Ig	inmunoglobulina
IgA	inmunoglobulina A
IgD	immunoglobulina D
IgE	immunoglobulina E
IgG	immunoglobulina G
IgM	immunoglobulina M
IP	immunoperoxidasa
ITCF	isotiocianato de fluoresceína
kb	kilobase
LCP	leucemia de células peludas
LELV	linfoma esplénico con linfocitos vellosos
LISS	medio salino de baja fuerza iónica (del inglés, *low ionic strength saline*)
LLA	leucemia linfoblástica aguda
LLC	leucemia linfática crónica
LLC/PL	leucemia linfática crónica con aumento de prolinfocitos
LLTA	leucemia/linfoma de linfocitos T del adulto
LMA	leucemia mieloide aguda
LMC	leucemia mieloide crónica
LPLB	leucemia prolinfocítica de células B
2-ME	2-mercaptoetanol
MESF	moléculas de fluorocromo soluble equivalente
MGG	May-Grünwald-Giemsa
MO	médula ósea
MPO	mieloperoxidasa
NEQAS	evaluación externa de la calidad nacional (del inglés, *national external quality assessment*)
NISS	medio salino de fuerza iónica normal (del inglés, *normal ionic strength saline*)
OMS	Organización Mundial de la Salud
p/v	peso/volumen
PAI	prueba de antiglobulina indirecta
PAS	ácido peryódico de Schiff
pb	par de bases
PBS	medio salino tamponado con fosfato (del inglés, *phosphate-buffered saline*)
PBS-azida-BSA	medio salino tamponado con fosfato que contiene azida sódica y albúmina de suero bovino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PCR-TR	reacción en cadena de la polimerasa de la transcriptasa reversa
PDA	prueba directa de antiglobulina
PDF	productos de degradación de la fibrina/fibrinógeno
PHHF	persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal
pI	punto isoeléctrico
PK	piruvatocinasa
PML	proteína codificada por el gen PML
POE	procedimiento operativo estándar
PVP	polivinil pirrolidina
QSC	*quantum simply cellular*
RE	recuento eritrocitario
RFLP	polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción
RL	recuento leucocitario
RTCN	recuento total de células nucleadas
RVH	región hipervariable
SDS	dodecil sulfato de sodio
SHb	sulfahemoglobina
SMD	síndrome o síndromes mielodisplásicos
SmIg	immunoglobulina de superficie (del inglés, *surface immunoglobulin*)
SMRA	sistema de mutación refractario a la amplificación
SP	sangre periférica
SSc	dispersión de la luz lateral (del inglés, *sideways light scatter*)
SSCP	polimorfismo de conformación monocatenario (del inglés, *single-strand conformation polymorphism*)
TAE	tris-acetato EDTA (tampón)
TBE	tris-borato EDTA (tampón)
TBS	salino tamponado con tris
TCR	receptor del linfocito T
TE	tris–EDTA (tampón)
TEB	tris-EDTA-borato (tampón)
TP	tiempo de protrombina
t-PA	activador del plasminógeno tisular
TR	transcriptasa reversa
TT	tiempo de trombina
TTPA	Tiempo de tromboplastina parcial activado
UI	unidades internacionales
UIBC	capacidad no saturada de fijación del hierro (del inglés, *unsaturated iron-binding capacity*)
UV	ultravioleta
v/v	volumen/volumen
VCM	volumen corpuscular medio
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
vol	volumen
VPM	volumen plaquetario medio

NOTA

Siguiendo las recomendaciones de la Organización Internacional de Estandarización (ISO), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y otras autoridades internacionales, hemos utilizado el sistema internacional (SI) para expresar las cantidades y las unidades (v. págs. 592-593). La concentración de las soluciones se expresa en mol/l (para las concentraciones de las sustancias) o en g/l (para las concentraciones de la masa). Aunque somos conscientes de que en algunos países aún se utilizan los g/dl para expresar la concentración de hemoglobina, hemos empleado g/l según la convención internacional. Para convertir esta cantidad en g/dl, basta con dividirla por 10.

Hemos indicado la fuente de un reactivo, equipo o dispositivo en caso de que haya un único fabricante o cuando se recomienda una fabricación específica. Si no se indica la fuente, el material o el equipo adecuado estarán disponibles, por lo general, en diferentes suministradores. Los catálogos de estos fabricantes y la información detallada sobre el uso de sus equipos exclusivos pueden encontrarse en sus páginas web.

1 Recogida y manipulación de la sangre

S. Mitchell Lewis y Noriyuki Tatsumi

Precauciones ante el riesgo biológico	1	Suero	5
Procedimiento estándar	1	Anticoagulantes	5
Sangre venosa	1	Efectos del almacenamiento sobre	
Bandeja de flebotomía	1	el recuento sanguíneo	6
Sangre capilar	3	Efectos del almacenamiento sobre	
Obtención de muestra de sangre capilar	3	la morfología de las células sanguíneas	7
Preparación de la extensión sanguínea	4	Homogeneidad de la muestra	8
Diferencias entre sangre venosa y capilar	4		

Al investigar la función fisiológica y las disfunciones de la sangre, es esencial seguir una metodología precisa y exacta para garantizar, tanto como sea posible, que las pruebas no proporcionen una información falsa por causa de errores técnicos. La obtención de la muestra es el primer paso de los procedimientos analíticos. Es importante utilizar los contenedores sanguíneos adecuados y evitar los fallos en la recogida de la muestra, en su almacenamiento y en el transporte hasta el laboratorio. Generalmente se utiliza sangre venosa para la mayoría de los exámenes hematológicos y las pruebas químicas; las muestras obtenidas por punción capilar cutánea pueden ser igualmente satisfactorias para algunos fines, a condición de que se obtenga un flujo adecuado de sangre (v. pág. 3), pero, en general, este procedimiento debe reservarse para los niños y para determinadas pruebas de detección en el «centro de atención» que sólo requieran una o dos gotas de sangre. La aspiración de la médula ósea se describe en el capítulo 6.

PRECAUCIONES ANTE EL RIESGO BIOLÓGICO

Hay que prestar un cuidado especial para evitar el riesgo de infección por diversos patógenos durante todas las etapas realizadas en el laboratorio y seguir en lo posible los procedimientos de seguridad descritos en el capítulo 25 a la hora de extraer sangre. El operador debe utilizar guantes desechables de goma fina o de plástico[a]. También es aconsejable la utilización de un delantal o de una bata protectora y, si es necesario, gafas o protectores oculares. Hay que tener cuidado para evitar las lesiones, sobre todo al manejar jeringas, agujas y lancetas.

Si es posible, hay que utilizar jeringas, agujas y lancetas estériles desechables y no reutilizarlas nunca. Tras su utilización, los productos reutilizables se deben esterilizar siempre en autoclave o en horno de aire caliente a 160 °C durante 1 h (v. pág. 556).

PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR

Los componentes de la sangre pueden alterarse debido a diversos factores, que se enumeran en la tabla 1.1. Es importante disponer de un procedimiento estándar para la recogida y la manipulación de las muestras sanguíneas. Se han publicado recomendaciones para la normalización de los procedimientos[1-3].

SANGRE VENOSA

Actualmente, lo habitual es que la recogida de muestras la realicen flebotomistas que han recibido una formación especial para ello, y existen directrices publicadas para establecer un programa de entrenamiento adecuado[1,4].

Bandeja de flebotomía

Es conveniente disponer de una bandeja que contenga todo lo necesario para la obtención de la muestra de sangre (tabla 1.2).

Jeringas de plástico y agujas desechables

Las agujas no deben ser demasiado finas, demasiado grandes o demasiado largas; las de 19 o de 21G[b] son apropia-

[a] Algunos individuos pueden presentar una reacción alérgica tanto a los guantes de goma como a los de plástico (v. pág. 556).

[b] La International Organization for Standardization ha establecido una norma (ISO 7864) que establece los diámetros siguientes para los distintos calibres: 19G = 1,1 mm; 21G = 0,8 mm; 23G = 0,6 mm.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 1.1. Causas de resultados falsos por discrepancias en la recogida de la muestra

Antes de la recogida
Haber ido al retrete en los 30 min anteriores; ingestión de agua o alimentos en las 2 h anteriores
Fumar
Actividad física (incluyendo el caminar rápidamente) en los 20 min anteriores
Estrés
Administración de fármacos o de suplementos dietéticos en las 8 h anteriores
Durante la recogida
Diferencias horarias (variación diurna)
Postura: tumbado, de pie o sentado
Hemoconcentración por mantenimiento prolongado de la presión del torniquete
Exceso de presión negativa al aspirar la sangre en la jeringa
Tipo de tubo incorrecto
Sangre capilar en vez de sangre venosa
Manejo de la muestra
Anticoagulante insuficiente o en exceso
Mezcla inadecuada de la sangre con el anticoagulante
Error en la identificación del paciente y/o de la muestra
Condiciones inadecuadas de almacenamiento de la muestra
Retraso en el transporte al laboratorio

Tabla 1.2. Bandeja de flebotomía

Jeringas y agujas
Torniquete
Contenedores para muestras (o sistema de tubos al vacío): simples y con diversos anticoagulantes
Formulario de petición
Torundas con alcohol isopropílico al 70% o con clorhexidina al 0,5%
Compresas de gasa o almohadillas de celulosa estériles
Apósitos adhesivos
Bolsas de plástico autosellantes
Gradillas para mantener las muestras verticales durante el proceso de llenado
(También debe haber un contenedor desechable resistente a la punción)

das para la mayoría de los adultos y las de 23G (sobre todo con una longitud de unos 15 mm) para los niños. Puede ser de utilidad extraer la sangre por medio de una aguja con alas («palomilla») insertada en un tubo de plástico de cierta longitud, que puede conectarse con la boquilla de la jeringa o con una aguja para atravesar el tapón de un tubo contenedor al vacío (v. más abajo la argumentación).

Contenedores de la muestra (tubos)

Los contenedores corrientes para las pruebas hematológicas están disponibles comercialmente con anticoagulantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) dipotásico, tripotásico o disódico. Estos tubos tienen marcado un nivel que indica la cantidad correcta de sangre que hay que añadir. También existen contenedores que contienen citrato trisódico, heparina o citrato dextrosa, y contenedores sin aditivo, que se utilizan cuando se necesita suero. Los requisitos de diseño y otras características de los contenedores para la recogida de muestras están descritos en diversas normas nacionales e internacionales (p. ej., la del International Council for Standardization in Haematology[5]), y existe también una norma europea (EN 14820). Desgraciadamente, aún no se ha alcanzado un acuerdo universal relativo a los colores para identificar los contenedores con distintos aditivos; los flebotomistas deben familiarizarse con los colores utilizados por sus propios suministradores.

Los sistemas de tubos al vacío, que son actualmente de uso corriente, consisten en un contenedor/tubo de vidrio o de plástico (con o sin anticoagulante) con un vacío definido, una aguja y un dispositivo portaagujas que fija la aguja al tubo. La principal ventaja radica en su tapón perforable, por lo que no es necesario retirarlo, ya sea para llenar el tubo o, posteriormente, para extraer las muestras para su análisis, minimizando de esta forma el riesgo de emisión en aerosol del contenido[6,7]. Un sistema al vacío es útil cuando se requieren múltiples muestras con distintos anticoagulantes. El vacío controla la cantidad de sangre que entra en el tubo, asegurando que la muestra sea la necesaria para las pruebas posteriores y para la proporción correcta de anticoagulante, cuando el tubo lo contiene. Los tubos al vacío recubiertos de silicona pueden utilizarse para las pruebas rutinarias de coagulación.

Procedimiento de la flebotomía

El flebotomista debe comprobar en primer lugar la identidad del paciente, verificar que se corresponde con la detallada en el formulario de petición y asegurarse de que la bandeja de flebotomía tiene todos los contenedores de muestras necesarios.

La sangre se extrae preferentemente de una vena antecubital o de otras venas visibles en el antebrazo por medio de un tubo al vacío o de una jeringa. Habitualmente, se recomienda que se limpie la piel con alcohol al 70% (p. ej., isopropanol) o con clorhexidina al 0,5% dejando que se seque por sí sola antes de la punción; sin embargo, han surgido ciertas dudas sobre la utilidad de esta práctica para evitar la infección en el sitio de venopunción[8]. También hay que tener cuidado al utilizar un torniquete para evitar que se contamine con la sangre, ya que se han notificado riesgos de infección durante la extracción de sangre[9]. El torniquete debe aplicarse inmediatamente por encima del sitio de venopunción y liberarse tan pronto como la sangre comienza a fluir en la jeringa o en el tubo al vacío; si se tarda demasiado en aflojarlo se producen alteraciones en el flujo y, como resultado de ello, hemoconcentración por estasis sanguínea en las venas[4]. Con práctica se debe poder obtener sangre venosa incluso de pacientes con venas difíciles (excepto en los niños muy pequeños). La aguja con palomilla tiene una utilidad especial cuando se necesitan varias muestras del mismo paciente.

El éxito de la venopunción se facilita manteniendo caliente el brazo del sujeto, colocando en la parte superior del

brazo un manguito de esfigmomanómetro inflado con una presión similar a la presión diastólica y golpeando suavemente la piel, unas cuantas veces, sobre el sitio que se va a puncionar. Después de limpiar y secar la zona que se va a puncionar y aplicar el torniquete, se pide al paciente que apriete el puño varias veces. Por lo general, las venas adecuadas para la punción se hacen evidentes. Si las venas son muy pequeñas, la utilización de una aguja con palomilla o una de 23G debería permitirnos obtener de forma satisfactoria al menos 2 ml de sangre. En pacientes obesos, puede ser más fácil utilizar una vena del dorso de la mano, tras calentarla por inmersión en agua caliente; sin embargo, este sitio no se recomienda en general porque las punciones venosas en esta zona tienden a sangrar en los tejidos periféricos más fácilmente que en otros lugares. No se debe intentar una venopunción sobre una cicatriz o un hematoma.

Si se utiliza una jeringa para la recogida de la sangre, hay que deslizar suavemente el pistón de la jeringa y no intentar extraer la sangre más deprisa que el propio llenado de la vena. Las muestras con anticoagulante se mezclan invirtiendo varias veces la posición de los contenedores. La hemólisis puede evitarse o minimizarse utilizando equipos limpios, extrayendo la sangre lentamente, no utilizando agujas demasiado finas, inyectando la sangre suavemente en el receptáculo y evitando que se forme espuma durante la extracción de la sangre y en el mezclado posterior con el anticoagulante. Si la sangre se extrae demasiado lentamente o se mezcla de forma inadecuada con el anticoagulante, se puede producir algún grado de coagulación. Tras la extracción, hay que tapar firmemente los contenedores para minimizar el riesgo de escapes.

Si no se consigue extraer la sangre, es importante mantener la calma y considerar las causas posibles. Entre ellas se incluye la mala técnica, debida sobre todo a clavar en vez de mantener la aguja paralela a la superficie de la piel a medida que se introduce; así se puede traspasar la vena. Tras dos o tres intentos sin éxito, es preferible remitir al paciente a otro extractor tras un corto descanso.

Después de extraer la sangre y aflojar el torniquete, se retira la aguja y se coloca una torunda estéril sobre el sitio de punción, aplicando presión en la torunda. Se debe elevar el brazo tras la extracción de la sangre y mantener la presión sobre la torunda con el brazo en alto durante unos cuantos minutos antes de comprobar que la hemorragia ha cesado por completo. Después se cubre el sitio de punción con un pequeño apósito adhesivo.

La obtención de sangre a partir de un catéter implantado o de una vía de infusión es una fuente potencial de errores. Dado que la práctica habitual es enjuagar las vías con heparina, hay que limpiarlas de heparina antes de que se extraiga la sangre para las pruebas de laboratorio. Si se están transfundiendo líquidos intravenosos en un brazo, la muestra de sangre no debe recogerse de ese brazo.

Procedimiento posflebotomía

De nuevo, el flebotomista debe comprobar la identidad del paciente y asegurarse de que se corresponde con la reseñada en el formulario de petición. Además de etiquetar el formulario de petición, es esencial que cada espécimen sea etiquetado con la identificación necesaria del paciente inmediatamente después de la obtención de las muestras. En las etiquetas se debe incluir al menos el apellido y el nombre o las iniciales, el número del hospital, la fecha de nacimiento y la fecha y el momento de la recogida de la muestra. La misma información debe aparecer en el formulario de petición, junto con el nombre del servicio o del departamento, el nombre del médico solicitante y las pruebas requeridas. Cuando sea pertinente, se debe pegar al contenedor y al formulario de petición un aviso de biopeligrosidad. Si se dispone de información automatizada del paciente, tanto la etiqueta como el formulario de petición deben tener un código de barras con los datos necesarios.

Hay que enviar las muestras en bolsas de plástico individuales separadas de los formularios de petición para impedir la contaminación de los formularios en caso de escapes. Por otra parte, los tubos de las muestras se deben colocar derechos en las gradillas y deben transportarse junto con los formularios de petición hasta el laboratorio.

Eliminación de los desechos

Sin separar la aguja de la jeringa, colocar ambas, junto con la torunda utilizada y cualquier otro apósito, en un contenedor resistente a la punción para desecharlos (v. página 558). Si no hay más remedio que eliminar la aguja de forma separada, hay que desprenderla de la jeringa únicamente con unas pinzas o con una herramienta similar. De forma alternativa, la aguja puede destruirse *in situ* con un aparato especial (p. ej., Sharp-X, Biomedical Disposal Inc., www.biodisposal.com).

SANGRE CAPILAR

La punción cutánea se puede realizar para obtener una pequeña cantidad de sangre, ya sea para su utilización directa en un proceso analítico, o para su recogida en tubos capilares revestidos con heparina para la determinación del hematocrito o en un dispositivo especial de microrrecogida con anticoagulante (pág. 4). Estos métodos se utilizan principalmente cuando no es posible obtener sangre venosa (p. ej., en niños menores de 1 año de edad, en casos de una gran obesidad o en las pruebas sanguíneas realizadas a la cabecera del enfermo).

Obtención de muestra de sangre capilar

La punción de la piel se realiza con una aguja o con una lanceta. En los adultos y en los niños mayores se puede obtener la sangre de un dedo; el sitio recomendado es la falange distal del tercer o cuarto dedo en su superficie palmar, entre 3 y 5 mm a partir del lecho ungueal. Anteriormente se utilizaba mucho el lóbulo auricular, pero actualmente su uso está desaconsejado, ya que el flujo sanguíneo que se obtiene a partir de él es tan reducido que no es representativo de la sangre circulante[1]. En los lactantes,

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

se pueden obtener muestras satisfactorias mediante una punción profunda de la superficie plantar del talón en el área mostrada en la figura 1.1. Como es preciso que el talón esté a una temperatura moderadamente elevada, puede ser necesario bañarlo en agua caliente. El área plantar central y la curvatura posterior no deben puncionarse en los lactantes pequeños para evitar el riesgo de lesión y la posible infección de los huesos del tarso subyacentes, sobre todo en los recién nacidos.

En primer lugar, se debe limpiar el área con alcohol al 70% (p. ej., isopropanol) y se dejará que se seque. A continuación, se procederá a puncionar la piel hasta una profundidad de 2-3 mm con una lanceta estéril desechable. La primera gota de sangre se retirará con una gasa estéril seca. Si es necesario, puede apretarse muy suavemente para promover el flujo libre de sangre. Se recogerá luego la segunda y las siguientes gotas directamente en una tira reactiva o con una micropipeta de 10 o 20 ml y se introducirá la muestra inmediatamente en el diluyente. Es esencial que haya un flujo de sangre libre y sólo es aceptable realizar una compresión muy suave; idealmente, debe haber un exudado lento pero espontáneo de grandes gotas de sangre. Si hay que apretar con fuerza para obtener sangre, los resultados no son fiables. Si la escasez de flujo es consecuencia de que el sitio de punción está frío y cianótico, las cifras obtenidas de hemoglobina y del recuento de hematíes y de leucocitos son, por lo general, demasiado altas.

Existen métodos para recoger la sangre en un tubo capilar fijado al tapón de un microcontenedor que permite que la sangre pase por acción capilar al interior del contenedor (p. ej., Microtainer[c])[10]. En otro sistema (Unopette[d]), un capilar calibrado se rellena completamente con sangre y se une con un volumen previamente medido de diluyente[11]. La punción adecuada, que origina un flujo libre de sangre, posibilita la recogida de un volumen mayor, gota a gota, en un contenedor de vidrio o de plástico[12].

Después de su utilización, las lancetas (y las agujas) deben colocarse en un contenedor resistente a la punción para la eliminación posterior de los desechos. No deben reutilizarse nunca en otro individuo.

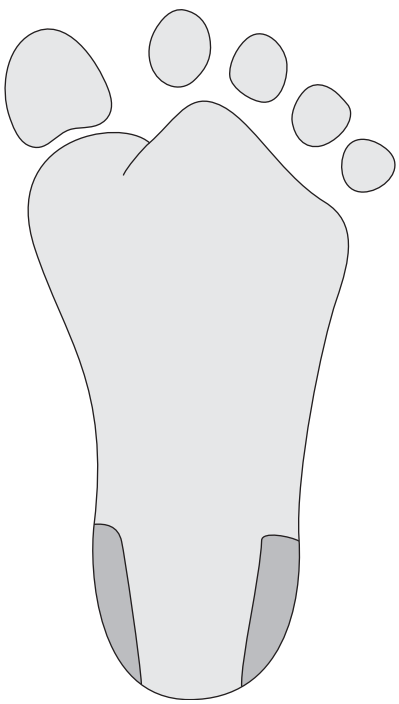


Figura 1.1. Punción cutánea en lactantes. La punción debe restringirse a las partes exteriores medial y lateral de la superficie plantar del pie indicadas por la zona sombreada.

Preparación de la extensión sanguínea

De forma ideal, la extensión sanguínea debe realizarse inmediatamente después de la recogida de la sangre. Ya que las muestras sanguíneas son, por lo general, enviadas al laboratorio con un retraso variable, hay ciertas ventajas derivadas de preparar las extensiones sanguíneas cuando se lleva a cabo la flebotomía. La bandeja de flebotomía puede incluir algunos portaobjetos y cubreobjetos de cristal limpios y hay que proporcionar a los flebotomistas la formación adecuada para la preparación de la extensión, como se describe en el capítulo 4. También disponemos de un dispositivo automático para la realización de la extensión[13]. Cuando las extensiones no se hacen sobre la marcha, deben realizarse en el laboratorio sin demora, tan pronto como se reciban las muestras.

DIFERENCIAS ENTRE SANGRE VENOSA Y CAPILAR

La sangre venosa y la sangre «capilar» no son exactamente lo mismo. La sangre de una punción cutánea es una mezcla de sangre procedente de arteriolas, venas y capilares y contiene algo de líquido intersticial e intracelular[1,4,14]. Aunque algunos estudios sugieren que las diferencias son insignificantes cuando se ha obtenido un flujo libre de sangre[15], otros muestran diferencias definitivas en la composición de las muestras obtenidas por punción cutánea y la sangre venosa en neonatos[16], niños[17] y adultos[18]. Las diferencias pueden acentuarse con el frío, que se reflejaría en un flujo sanguíneo capilar más lento[4].

El hematocrito (Hto), el recuento de hematíes y la concentración de hemoglobina (Hb) de la sangre capilar son ligeramente mayores que los de la sangre venosa. Los recuentos totales de leucocitos y de neutrófilos son superiores en cerca de un 8%; el recuento de monocitos es superior en un 12% y en algunos casos hasta en un 100%, sobre todo en niños. En cambio, el recuento plaquetario parece ser mayor en la sangre venosa que en la capilar, siendo como media aproximadamente superior en un 9% y en algunos casos en hasta un 32%[16-18]. Este efecto puede ser el resultado de la adhesión de las plaquetas al sitio de punción cutánea.

[c] BD Ltd.
[d] BD Ltd.

SUERO

La diferencia entre plasma y suero radica en que este último no contiene fibrinógeno ni algunos de los factores de coagulación. La sangre recogida para la obtención del suero debe guardarse en tubos estériles con tapones o en tubos de recogida al vacío simples (sin anticoagulantes) comercialmente disponibles, y dejar que coagule sin perturbaciones durante cerca de 1 h a temperatura ambiente[e]. Después, hay que desprender suavemente el coágulo de las paredes del contenedor con ayuda de un bastoncillo de madera o de una varilla delgada de plástico o de cristal. El manejo brusco puede causar la lisis. Hay que cerrar el tubo con un tapón o capuchón. Algunos tubos contienen un activador de la coagulación junto con un gel para acelerar la separación del suero (p. ej., los tubos separadores de suero[f]).

Los tubos, con o sin separador de suero, se centrifugan durante 10 min a aproximadamente 1.200 g. El suero sobrenadante es pipeteado en otro tubo y centrifugado de nuevo durante 10 min a aproximadamente 1.200 g. El suero sobrenadante se transfiere a los tubos para realizar las pruebas o para almacenarlo. En la mayoría de las pruebas, se debe mantener el suero a 4 °C hasta que se utilice, pero si se retrasa la prueba, se puede almacenar el suero a –20 °C hasta 3 meses y a –40 °C o menos para un almacenamiento a largo plazo. Las muestras congeladas deben descongelarse en el banco o en un baño de agua a temperatura ambiente; después deben invertirse varias veces para asegurar la homogeneidad antes de utilizarlas en una prueba. Las muestras descongeladas no se pueden volver a congelar.

Desfibrinación de la sangre total

El procedimiento descrito en el capítulo 28 (v. pág. 602) puede utilizarse para obtener hematíes libres de plasma, por ejemplo para investigar ciertos tipos de anemia hemolítica. Hay una buena preservación de la morfología celular en este proceso.

Aglutininas frías

Si hay que titular las aglutininas frías, se debe mantener la sangre a 37 °C hasta que se haya separado el suero. Si se sabe que hay aglutininas frías en concentraciones elevadas, lo mejor es traer al paciente al laboratorio y extraer la sangre con una jeringa previamente calentada para depositar después la sangre en contenedores que se hayan mantenido a 37 °C. Dichos contenedores, una vez rellenos, deben colocarse inmediatamente en un baño de agua caliente a 37 °C. De esta forma, se puede obtener un suero libre de hemoglobina, incluso en presencia de anticuerpos fríos capaces de producir aglutinación a temperaturas tan elevadas como 30 °C. Una forma práctica de calentar la jeringa es colocarla en su contenedor durante 10 min en un horno a aproximadamente 50 °C o durante 30 min en una incubadora a 37 °C. Cuando se retrae el coágulo de la muestra y se pone de manifiesto el suero claro, se extrae dicho suero con una pipeta Pasteur y se transfiere a un tubo que haya sido calentado por inmersión en un baño de agua. A continuación se centrifuga rápidamente para eliminar cualquier hematíe en suspensión.

[e] Generalmente, se considera temperatura ambiente entre 18 y 25 °C.
[f] BD Ltd.

ANTICOAGULANTES

El EDTA y el citrato sódico eliminan el calcio, que es esencial para la coagulación. El calcio precipita como oxalato insoluble (cuyos cristales pueden verse en la sangre oxalatada) o se aglutina en una forma no ionizada. La heparina se une a la antitrombina, inhibiendo de esta forma la interacción de diversos factores de coagulación.

El EDTA se utiliza para los recuentos sanguíneos; el citrato sódico para las pruebas de coagulación y la velocidad de sedimentación globular (VSG). Para una mejor conservación a largo plazo de los hematíes con vistas a la realización de determinadas pruebas y con fines de transfusión, se utiliza el citrato junto con la dextrosa en forma de ácido-citrato-dextrosa (ACD), citrato-fosfato-dextrosa (CPD) o solución de Alsever (v. pág. 587). Las mezclas de anticoagulantes se utilizan también para compensar las desventajas individuales de cada uno y para satisfacer las necesidades del proceso analítico[19,20]; estas mezclas son el ACD, el CPD o la heparina combinados con EDTA, y el EDTA, el citrato o a la heparina combinados con fluoruro sódico. Para realizar una citometría de flujo se puede utilizar cualquier anticoagulante en la recogida de sangre[19,21].

Ácido etilendiaminotetraacético

Las sales de sodio y de potasio del EDTA son anticoagulantes potentes y están especialmente indicadas para los trabajos hematológicos de rutina. El EDTA actúa por medio de su efecto quelante sobre las moléculas de calcio de la sangre. Para conseguir la quelación se requiere una concentración de 1,2 mg de sal anhidra por ml de sangre (4 mmol). La sal dipotásica es muy soluble (1.650 g/l) y se utiliza con preferencia sobre la sal disódica, que es considerablemente menos soluble (108 g/l)[22]. El revestimiento de la superficie interna del tubo de recogida de la sangre con una capa delgada de EDTA mejora la velocidad de su captación por la sangre.

La sal dilítica del EDTA es igualmente eficaz como anticoagulante[23], y su utilización tiene la ventaja de que la misma muestra de sangre puede utilizarse para la investigación química. Sin embargo, es menos soluble que la sal dipotásica (160 g/l).

El Clinical and Laboratory Standards Institute (anteriormente el National Committee for Clinical Laboratory Standards, o NCCLS) recomienda el uso en Estados Unidos de la sal tripotásica dispensada en forma líquida[3]. Sin embargo, la sangre añadida a esta solución estará ligeramente diluida y la sal tripotásica ocasiona un cierto encogimiento de los hematíes, lo que se traduce en un 2-3% de reducción en el Hto a las 4 h de la recogida, seguido por un incremento gradual en el volumen corpuscular medio (VCM). En cambio, estas modificaciones son insignificantes cuando se

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

utiliza la sal dipotásica[1,4]. En consecuencia, el International Council for Standardization in Haematology aconseja el uso de la sal dipotásica a una concentración de 1,50 ± 0,25 mg/ml de sangre[24]. El EDTA-Na_3 no se recomienda debido a su pH elevado.

El exceso de EDTA, independientemente de la sal utilizada, afecta tanto a los hematíes como a los leucocitos, produciendo su encogimiento y la aparición de cambios degenerativos. El EDTA por encima de los 2 mg/ml de sangre puede ocasionar una reducción significativa en el Hto por centrifugación y un aumento en la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM)[4]. Las plaquetas también se ven afectadas; el exceso de EDTA hace que se hinchen y se desintegren, lo que da lugar a un recuento plaquetario artificialmente elevado, porque los fragmentos son lo suficientemente grandes para ser considerados como plaquetas normales. Por tanto, hay que asegurarse de que la cantidad de sangre añadida sea la correcta y de que, por medio de inversiones repetidas del contenedor, el anticoagulante se mezcle completamente con la sangre que se le añade. Es posible que en las extensiones sanguíneas realizadas a partir de sangre con EDTA no puedan observarse los punteados basófilos de los hematíes en la intoxicación con plomo. También se ha demostrado que el EDTA produce una leucoaglutinación que afecta tanto a los neutrófilos como a los linfocitos[25], y es responsable de la actividad de un autoanticuerpo antiplaquetario que aparece de forma natural y que puede, en ocasiones, causar la adherencia de las plaquetas a los neutrófilos en las extensiones sanguíneas (v. pág. 97). Se ha observado que la activación de los monocitos, medida por la liberación del factor tisular y por la actividad del factor de necrosis tumoral, es menor con el EDTA que con el citrato y la heparina. De forma similar, la activación de los neutrófilos medida por la liberación de la lactoferrina inducida por los lipopolisacáridos es menor con el EDTA. Parece que el EDTA también suprime la degranulación plaquetaria[26].

Citrato trisódico

En los estudios de coagulación se añaden 9 volúmenes de sangre a 1 volumen de una solución de citrato sódico de 109 mmol/l (32 g/l de $Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$[g])[27]. Esta proporción de anticoagulante y sangre es fundamental, ya que los efectos osmóticos y los cambios en la concentración del ion calcio libre afectan a los resultados de las pruebas de coagulación.

Para determinar la VSG, se añaden 4 volúmenes de sangre a 1 volumen de la solución de citrato sódico (109 mmol/l) mezclándose inmediatamente de forma adecuada. La mezcla se introduce en un tubo Westergren[28].

Heparina

Las sales de litio o de sodio de la heparina a una concentración de 10-20 UI por ml de sangre son un anticoagulante corrientemente utilizado para las pruebas bioquímicas, las determinaciones de urgencia y las gasometrías. No alteran el tamaño de los hematíes y su uso está recomendado en las situaciones en que es importante reducir al mínimo la posibilidad de lisis después de la extracción de la sangre. Es, por tanto, el mejor anticoagulante para las pruebas de fragilidad osmótica y es apropiada para el inmunofenotipado.

Sin embargo, la heparina no es adecuada para realizar los recuentos sanguíneos porque a menudo induce la formación de agregados de plaquetas y de leucocitos[4,29,30]. Tampoco debe utilizarse para la realización de extensiones sanguíneas porque da una débil coloración azul de fondo cuando las extensiones se tiñen con la tinción de Romanowsky, sobre todo en presencia de proteínas anormales. Inhibe la actividad enzimática[19] y no debe utilizarse en el estudio de la reacción en cadena por la polimerasa con enzimas de restricción[31].

EFECTOS DEL ALMACENAMIENTO SOBRE EL RECUENTO SANGUÍNEO

Cuando se almacena la sangre con anticoagulantes a temperatura ambiente se producen diversos cambios; éstos son más rápidos cuanto más elevada es dicha temperatura. Se originan independientemente del anticoagulante, aunque son menos marcados en la sangre con ACD, CPD o solución de Alsever que en la sangre con EDTA, y mayores con la sal tripotásica de EDTA que con la dipotásica. Los recuentos de hematíes, de leucocitos y de plaquetas y los índices eritrocitarios permanecen habitualmente estables durante 8 h tras la recogida de sangre, aunque, a medida que los hematíes comienzan a hincharse, el Hto y el VCM se incrementan, aumenta la fragilidad osmótica y disminuye la VSG. Cuando la sangre se mantiene a 4 °C, los efectos en el recuento sanguíneo son, por lo general, insignificantes hasta las 24 h. Por tanto, para muchas determinaciones, se puede conservar la sangre de forma segura durante la noche en el refrigerador si se toman precauciones para que no se congele. Sin embargo, es preferible hacer el recuento de leucocitos y sobre todo de plaquetas a las 2 h, y hay que señalar que la reducción en el recuento leucocitario y la reducción progresiva en el recuento linfocitario absoluto pueden ser muy notables a las pocas horas, sobre todo si hay una cantidad excesiva de EDTA (>4,5 mg/ml)[21]. El almacenamiento más allá de 24 h a 4 °C produce datos falsos en los recuentos diferenciales automatizados de leucocitos, aunque la magnitud de las variaciones depende de las prestaciones del instrumento y de las recomendaciones del fabricante, que deben seguirse cuando se utiliza un método automático de recuento. Un estudio, en el que se utilizó un analizador de apertura-impedancia para el análisis de sangre dejada a temperatura ambiente, mostró que el recuento de leucocitos y de neutrófilos permanecía estable durante 2-3 días, pero el resto de los leucocitos sólo permanecieron estables durante unas pocas horas[32].

Los recuentos reticulocitarios no se modifican cuando la sangre se mantiene con un anticoagulante, ya sea EDTA o

[g] O 38 g/l de $2Na_3C_6H_5O_7.\ 11\ H_2O$.

ACD, durante 24 h a 4 °C, pero a temperatura ambiente el recuento comienza a disminuir a las 6 h. Los hematíes nucleados desaparecen de la muestra sanguínea en 1-2 días a temperatura ambiente.

La concentración de hemoglobina se mantiene sin cambios durante días, siempre y cuando la sangre no se infecte, lo que se pondría de manifiesto por la turbidez o decoloración de la muestra. Sin embargo, en 2-3 días y sobre todo a alta temperatura ambiente, la sangre comienza a lisarse, lo que da como resultado una disminución en los recuentos de hematíes y en el Hto, con un aumento de la HCM y de la CHCM.

La estabilidad de las pruebas de coagulación es fundamental para el diagnóstico y el tratamiento de las coagulopatías. El NCCLS recomienda que las pruebas se lleven a cabo a las 2 h cuando la sangre o el plasma se han almacenado a 22-24 °C, a las 4 h a 4 °C, a las 2 semanas a –20 °C y a los 6 meses a –70 °C[2].

Para las pruebas en plasma o suero, la sangre debe centrifugarse dentro de un plazo de 5 h tras la recogida. Para los análisis de vitamina B_{12} y folato, se debe mantener el suero o el plasma a 4 °C o a –20 °C si se requiere un almacenamiento superior a las 2-3 semanas. En el almacenamiento a largo plazo, hay que dividir las muestras en varias alícuotas para evitar las congelaciones y descongelaciones repetidas.

El manejo inapropiado de las muestras sanguíneas durante el transporte al laboratorio (p. ej., la agitación excesiva) puede causar hemólisis, coagulación parcial y desintegración celular. El envío de las muestras necesita un empaquetado especial.

EFECTOS DEL ALMACENAMIENTO SOBRE LA MORFOLOGÍA DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS

Los cambios en la morfología de las células sanguíneas se producen fácilmente, incluso en el almacenamiento a corto plazo. Estos cambios no son únicamente el resultado de la presencia de un anticoagulante, ya que pueden ocurrir también en la sangre desfibrinada. Independientemente del anticoagulante, las extensiones hechas con sangre que ha permanecido durante menos de 1 h a temperatura ambiente no se distinguen fácilmente de las realizadas tras la recogida de la sangre. A las 3 h, se pueden discernir los cambios y a las 12-18 h son muy llamativos. Hay afectación de algunos, aunque no de todos, los neutrófilos; sus núcleos pueden teñirse de forma más homogénea que en la sangre fresca, los lóbulos nucleares pueden separarse y el borde citoplasmático presentarse deshilachado o menos definido; pequeñas vacuolas aparecen en el citoplasma (fig. 1.2A y B). Algunos o muchos de los monocitos grandes desarrollan cambios notables; aparecen pequeñas vacuolas en el citoplasma y el núcleo sufre una lobulación irregular, que puede llegar casi a la desintegración (fig. 1.2C). Los linfocitos sufren cambios similares: en el citoplasma pueden observarse algunas vacuolas, los núcleos se tiñen de forma más homogénea de lo habitual y, en algunos, los núcleos sufren una lobulación (dando lugar a núcleos con dos o tres lóbulos) (fig. 1.2D–F). Los hematíes normales resultan poco afectados por permanecer hasta 6 h a temperatura ambiente. Los períodos superiores producen una progresiva espiculación (crenación) y formación de esferocitos (fig. 1.2B, E y F). El exceso de EDTA origina un grado notable de espiculación a las pocas horas. Todos los cambios previamente mencionados están retardados, aunque no abolidos, en la sangre que se mantiene a 4 °C. Su aparición subraya la importancia de hacer las extensiones tan pronto como sea posible tras la recogida de la sangre. No obstante, como norma, es aceptable un retraso de hasta 3 h.

Estas modificaciones producidas por la aparición de artefactos deben distinguirse de la apoptosis, que es un proceso controlado de muerte celular programada que se produce cuando las citocinas y los factores de crecimiento que regulan la supervivencia celular están deplecionados

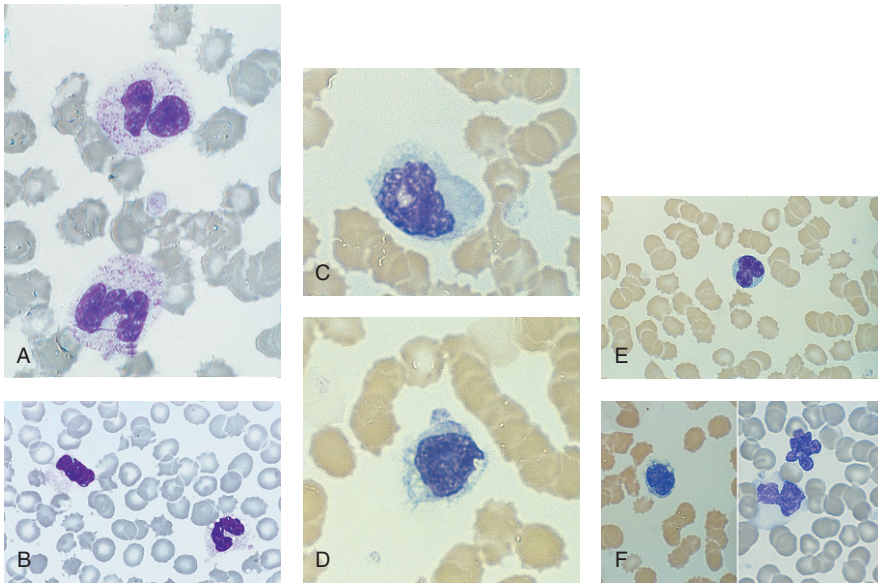


Figura 1.2. Efectos del almacenamiento sobre la morfología de las células sanguíneas. Microfotografías de extensiones realizadas con sangre y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) tras 24 h a 20 °C. A y B, neutrófilos polimorfonucleares; C, monocitos; D, E y F, linfocitos. La espiculación (crenación) de los hematíes es apreciable en B y E.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

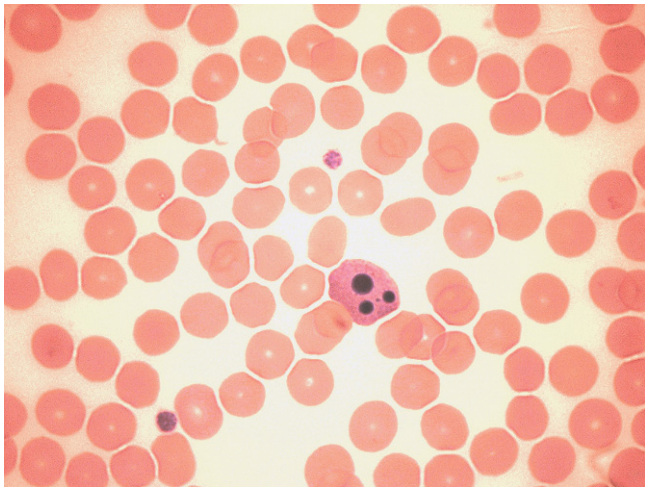


Figura 1.3. Características morfológicas de la apoptosis.

o inhibidos, siendo la disfunción mitocondrial el evento clave[33,34]. La apoptosis se caracteriza morfológicamente (fig. 1.3) por encogimiento celular con condensación citoplasmática alrededor de la membrana nuclear e indentaciones en el núcleo, seguido de su fragmentación; por último, los restos celulares forman unas masas basófilas extensas (los cuerpos apoptósicos). Los neutrófilos en apoptosis con un único cuerpo apoptósico pueden confundirse con los hematíes nucleados si no se valoran las características citoplasmáticas. Los restos celulares se eliminan de la circulación por fagocitosis y, habitualmente, en las extensiones sólo se observa una célula apoptósica ocasional rodeada de células normales[35]. Las células apoptósicas pueden verse con mayor frecuencia en las leucemias.

HOMOGENEIDAD DE LA MUESTRA

Para asegurar la dispersión uniforme de las células sanguíneas, es esencial que los especímenes se mezclen de forma eficaz inmediatamente antes de tomar una muestra para la prueba. Colocar el tubo de la muestra en un mezclador por rotación mecánica durante al menos 2 min o invertir el tubo manualmente unas 8-10 veces. Si la muestra ha sido almacenada a 4 °C, estará viscosa y hay que dejar que la sangre se caliente a temperatura ambiente antes de mezclarla.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tatsumi N, Miwa S, Lewis SM, International Council for Standardization in Haematology/International Society of Hematology 2002 Specimen collection, storage, and transportation to the laboratory for hematological tests. International Journal of Hematology 75:261-268.
2. NCCLS 2003 Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. Approved standard, 5th edition. H3-A5. NCCLS, Wayne PA.
3. NCCLS 2003 Tubes and additives for venous blood specimen collection. Approved standard, 5th edition. NCCLS, Wayne PA.
4. Van Assendelft OW, Simmons A 1995 Specimen collection, handling, storage and variability. In: Lewis SM, Koepke JA (eds) Hematology Laboratory Management and Practice, p. 109-127. Butterworth Heinemann, Oxford.
5 Tatsumi N, van Assendelft OW, Naka K 2002 ICSH recommendation for blood specimen collection for hematological analysis. Laboratory Hematology 8:1-6.
6. Katz L 1975 Evacuated blood-collection tubes—the backflow hazard. Canadian Medical Association Journal 113:208-213.
7. Katsuda I 2003. Safety of evacuated-blood collection tubes. Japanese Journal of Clinical Pathology 23 (suppl 2):168.
8. Sutton CD, White SA, Edwards R 1999 A prospective controlled trial of the efficacy of isopropyl alcohol wipes before venesection in surgical patients. Annals of the Royal College of Surgeons 81:183-186.
9. Golder M, Chen CLH, O'Shea S et al 2000 Potential risk of cross-infection during peripheral-venous access by contaminated tourniquets. Lancet 355:44.
10. Meitis S 1988 Skin puncture and blood collection techniques for infants: updates and problems. Clinical Chemistry 34:1890-1894.
11. Hicks JR, Rowland GL, Buffone GJ 1976 Evaluation of a new blood collection device ("Microtainer") that is suitable for pediatric use. Clinical Chemistry 22:2034-2036.
12. Freudlich MH, Gerarde HW 1963 A new, automatic disposable system for blood count and hemoglobin. Blood 21:648-655.
13. Tatsumi N, Pierre R 2002 Automated image processing; past, present, and future of blood cell morphology identification. Clinics in Laboratory Medicine 22:299-316.
14. Conway AM, Hinchliffe RF, Earland J et al 1998 Measurement of hemoglobin using single drops of skin puncture blood: is precision acceptable? Journal of Clinical Pathology 51:248-250.
15. Yang Z-W, Yang S-H, Chen L, et al 2001 Comparison of blood counts in venous, finger tip and arterial blood and their measurement variation. Clinical and Laboratory Haematology 23:155-159.
16. Kayiran SM, Özbek N, Turan M, et al 2003 Significant differences between capillary and venous complete blood counts in the neonatal period. Clinical and Laboratory Haematology 25:9-16.
17. Daae LNW, Hallerud M, Halvorsen S 1988 A comparison between haematological parameters in "capillary" and venous blood samples from hospitalized children aged 3 months to 14 years. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation 51:651-654.
18. Daae LNW, Halvorsen S, Mathison PM, et al 1988 A comparison between haematological parameters in "capillary" and venous blood from healthy adults. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation 48:723-726.
19. Narayanan S 2000 The pre-analytic phase: an important component of laboratory medicine. American Journal of Clinical Pathology 113:429-457.
20. Tatsumi N 2003 Universal anticoagulants. Japanese Society of Thrombosis and Haemostasis 13:158-168.
21. NCCLS 1997 Clinical application of flow cytometry: quality assurance and immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes. Document H43-A, NCCLS, Wayne PA.
22. Hadley GG, Weiss SP 1955 Further notes on use of salts of

ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA) as anticoagulants. American Journal of Clinical Pathology 25:1090-1093.
23. Sacker LS, Sanders KE, Page B et al 1959 Dilithium sequestrene as an anticoagulant. Journal of Clinical Pathology 12:254-257.
24. International Council for Standardization in Haematology 1993. Recommendations for ethylenediaminetetraacetic acid anticoagulation of blood for blood cell counting and sizing. American Journal of Clinical Pathology 100:371-372.
25. Deal I, Hernandez AM, Pierre RV 1995 Ethylenediamine tetraacetic acid-associated leukoaggulutination. American Journal of Clinical Pathology 103:338-340.
26. Engstad CS, Gutteberg TJ, Osterud B 1997 Modulation of cell activation by four commonly used anticoagulants. Thrombosis and Haemostasis 77:690-696.
27. Ingram GIC, Hills M 1976 The prothrombin time test; effect of varying citrate concentration. Thrombosis and Haemostasis 36:230-236.
28. International Committee for Standardization in Haematology 1977 Recommendation for measurement of erythrocyte sedimentation rate of human blood. American Journal of Clinical Pathology 66:505-507.
29. Salzman EW, Rosenberg RD 1980 Effect of heparin and heparin fractions on platelet aggregation. Journal of Clinical Investigation 65:64-73.
30. Hirsh J, Levine NM 1992 Low molecular weight heparin. Blood 79:1-9.
31. Yokota M, Tatsumi N, Nathalang O et al 1999 Effects of heparin on polymerase chain reaction for blood white c ells. Journal of Clinical and Laboratory Analysis 13:133-140.
32. Gulati GL, Hyland LJ, Kocher W, et al 2002 Changes in automated complete blood cell count and differential leucocyte count results induced by storage of blood at room temperature. Archives of Pathology and Laboratory Medicine 126:336-342.
33. Kerr JF, Wylie AH, Curie AR 1972 Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. British Journal of Cancer 26:239-257.
34. Wylie AH, Kerr JFR, Currie AR 1980 Cell death: the significance of apoptosis. International Review of Cytology 68:251-306.
35. Lach-Szyrma V, Brito-Babapulle F 1999 The clinical significance of apoptotic cells in peripheral blood smears. Clinical and Laboratory Haematology 21:277-280.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

2 Intervalos de referencia y valores normales

S. Mitchell Lewis

Intervalos de referencia	11	Componentes de los eritrocitos	16
Procedimientos estadísticos	11	Cambios transitorios	17
Límites de confianza	12	Recuento leucocitario	18
Valores normales de referencia	13	Recuento plaquetario	19
Variaciones fisiológicas en el recuento sanguíneo	16	Otros componentes sanguíneos	19

Ciertos factores afectan a los valores hematológicos en los individuos aparentemente sanos. Como se ha descrito en el capítulo 1, entre ellos se encuentran la técnica y el momento de la recogida sanguínea, el transporte y el almacenamiento de las muestras, las diferencias en la posición del sujeto a la hora de tomar la muestra, la actividad física previa o si el sujeto está confinado en su cama. Las variaciones en los métodos analíticos utilizados también pueden afectar a las mediciones. Todo esto puede estandarizarse.

Más problemáticas son las variables inherentes al sexo, la edad, la ocupación, la constitución corporal, la herencia genética y la adaptación a la dieta y al entorno (sobre todo a la altitud). Todos estos factores deben tenerse en cuenta cuando se establecen los valores fisiológicos normales. Además, en cualquier investigación poblacional realizada para obtener datos a partir de los cuales se puedan construir los rangos de normalidad, es difícil asegurar que los sujetos «normales» están completamente sanos y no tienen deficiencias nutricionales (sobre todo deficiencia de hierro, que es prevalente en muchos países), infecciones crónicas leves, infestaciones parasitarias ni presentan los efectos del tabaquismo.

Los valores hematológicos normales y anómalos se solapan, y un valor dentro del rango admitido como normal puede ser definitivamente patológico en un sujeto en particular. Por todas estas razones, el concepto de «valores normales» y «rangos normales» ha sido sustituido por el de *valores de referencia* y *rango de referencia*, que se definen por los *límites de referencia* y se obtienen por las mediciones en la *población de referencia* de una prueba en particular. El rango de referencia se denomina también *intervalo de referencia*[1,2]. De forma ideal, cada laboratorio debe establecer un banco de datos de valores de referencia que tengan en cuenta las variables mencionadas más arriba, de forma que los resultados de un individuo puedan expresarse e interpretarse en relación con una población comparable, aparentemente normal, en la medida en que puede definirse lo que es normal y lo que no.

INTERVALOS DE REFERENCIA

Se puede establecer un intervalo de referencia para una población determinada a partir de las mediciones de un número relativamente pequeño de sujetos (se analizará más adelante), si se asume que son representativos de la población en su totalidad[2]. Hay que estandarizar las condiciones para la obtención de muestras de los individuos y los procedimientos analíticos, y analizar los datos de forma separada según las diferentes variables, tales como los individuos encamados o ambulatorios, los fumadores o no fumadores, y así sucesivamente. Las muestras se recogerán aproximadamente a la misma hora del día, con preferencia por la mañana antes del desayuno, sin haber ingerido comida después de las 9 p.m. de la noche anterior y habiendo restringido el consumo de alcohol a una botella de cerveza o una cantidad equivalente de otra bebida alcohólica en este mismo período de tiempo[3].

PROCEDIMIENTOS ESTADÍSTICOS

En las mediciones biológicas, se asume habitualmente que los datos encajarán en un patrón especificado, ya sea simétrico (Gaussiano) o asimétrico con una distribución sesgada (no Gaussiano). En una distribución Gaussiana, la *media aritmética* ($\bar{\chi}$) puede obtenerse dividiendo la suma de todas las mediciones por el número de observaciones. La *moda* es el valor que se presenta con más frecuencia y la *mediana* (m) es el punto en el que hay el mismo número de observaciones por encima y por debajo de él. En una dis-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

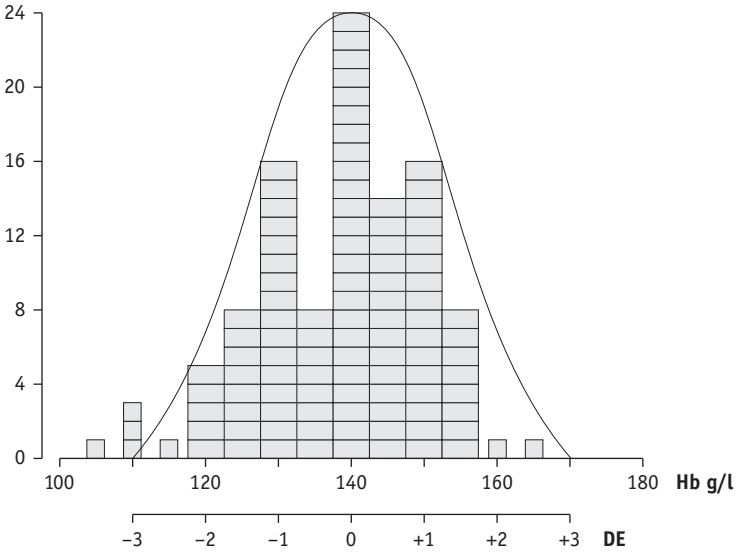


Figura 2.1. Ejemplos del establecimiento de un intervalo de referencia. Histograma de los datos relativos a las mediciones de hemoglobina en una población, con una curva de Gauss sobrepuesta. Las ordenadas muestran la cantidad encontrada en cada punto de referencia. La media fue de 140 g/l; se indican los intervalos de referencia en 1 DE, 2 DE y 3 DE.

tribución Gaussiana real todos estos parámetros deberían ser iguales. La desviación estándar (DE) puede calcularse según se describe en la página 587.

Si los datos siguen una distribución Gaussiana, cuando se representan en un histograma de frecuencia se obtiene el patrón que se muestra en la figura 2.1. Tomando la moda y la DE como puntos de referencia, se ha superpuesto una curva de Gauss sobre el histograma. A partir esta curva, se pueden determinar los límites prácticos de referencia incluso si el histograma original incluye algunos resultados extremos de sujetos que no pertenecen a la población normal. Los límites que representan el intervalo de referencia del 95% se calculan a partir de la media aritmética ±2 DE (o de forma más precisa, ±1,96 DE).

Cuando hay una distribución logarítmica normal (asimétrica) de las mediciones, el intervalo hasta −2 DE puede incluso extenderse hasta el cero (fig. 2.2A). Para evitar esta anomalía, se representan los datos en un papel de gráfico semilogarítmico para obtener un histograma con distribución normal (fig. 2.2B). Para calcular la media y la DE hay que convertir los datos en sus logaritmos por medio de una calculadora con la función apropiada. El valor logarítmico medio se obtiene sumando los logaritmos de todas las mediciones y dividiendo la suma por el número de observaciones. El logaritmo de la DE se calcula con la fórmula de la página 587 y los resultados se convierten en sus antilogaritmos para expresar los datos en la escala aritmética. Este proceso se puede realizar también en un ordenador con un programa estadístico apropiado.

Cuando no es posible hacer una suposición sobre el tipo de distribución, se puede utilizar un procedimiento no paramétrico en su lugar para obtener la mediana y la DE. Con este fin, se clasifican los datos y se ordenan de menor a mayor según sus valores cuantitativos, y después se calcula la mediana como se muestra en la tabla 2.1. Para obtener una aproximación de la DE, se lee y se divide por 1,35 el intervalo que comprende el 50% central de la distribución (es decir, entre el 25 y el 75% de los resultados). Este valor representa 1 DE[4].

Límites de confianza

Con cualquiera de los métodos de análisis, se puede obtener una estimación razonablemente fiable con 40 valores, aun-

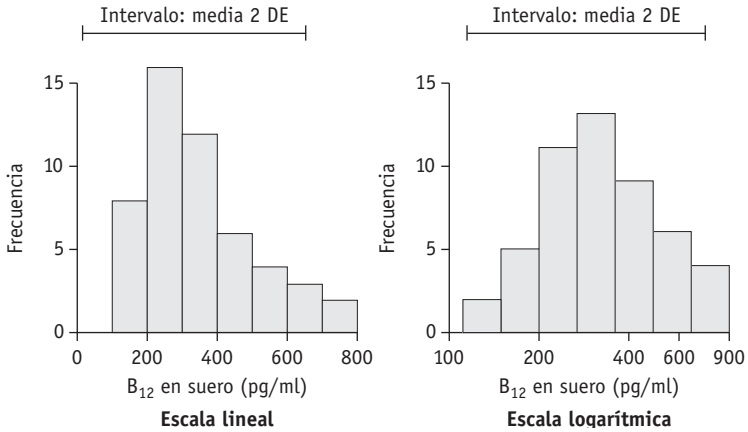


Figura 2.2. Ejemplos de conversión a una distribución logarítmica normal. Datos de las mediciones de vitamina B_{12} en una población. A: Escala aritmética: Media 340; intervalo 2 DE calculado como 10-665 pg/ml. B: Escala geométrica: Media 308; intervalo 2 DE calculado como 120–780 pg/ml.

Tabla 2.1. Ilustración del cálculo de la mediana[a]

N.º de rango	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Hemoglobina g/l	110	112	113	115	115	118	120	122	124	126	127
Si el total (n) es un número impar, la posición de la mediana en el rango se calcula mediante $\frac{(n+1)}{2}$ (es decir, posición 6 = 118 g/l)											
N.º de rango	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Hemoglobina g/l	110	112	113	115	115	118	120	122	124	126	
Si el total (n) es un número par, la posición de la mediana en el rango está entre $\frac{n}{2}$ y $\frac{(n+2)}{2}$ (es decir, entre las posiciones 5 y 6 del rango = $\frac{(115+118)}{2}$ = 116,5 g/l)											

[a]En la práctica se requeriría un número mayor para que la estadística fuera significativa (v. texto).

que es preferible un número mayor (120 o más) (fig. 2.3)[5]. Cuando no se puede disponer de un conjunto grande de valores de referencia y no es posible hacer un cálculo preciso, podemos también utilizar un número más pequeño de valores como guía clínica útil. Los límites de confianza definen la fiabilidad (p. ej., 95 o 99%) de los valores de referencia establecidos para evaluar si los resultados de una prueba son significativos, sobre todo cuando éstos se sitúan en la línea que separa lo normal y lo anómalo. El cálculo de los límites de confianza se describe en la página 587. Otra medición importante es el coeficiente de variación (CV) de la prueba, porque es muy probable que un CV amplio influya en su utilidad clínica (v. pág. 538).

VALORES NORMALES DE REFERENCIA

Los datos mostrados en las tablas 2.2, 2.3 y 2.4 proporcionan una guía general de los valores de referencia normales que pueden aplicarse a la mayoría de los adultos y niños sanos, respectivamente, en los países industrializados. Los datos se han obtenido de observaciones personales, así como de publicaciones diversas[6-11]. Sin embargo, se pueden encontrar intervalos ligeramente diferentes en laboratorios individuales que utilicen distintos analizadores y métodos. El intervalo de referencia, que comprende un rango de ±2 DE a partir de la media, indica los límites que deberían abarcar al 95% de los sujetos normales; el 99% de dichos sujetos estarían incluidos en el rango de ±3 DE. En algunos valores se han tenido en consideración las diferencias de edad y de sexo. Incluso así, los amplios intervalos mostrados en varias pruebas reflejan la influencia de diversos factores, como se describe más abajo. En condiciones estandarizadas, cabría esperar unos intervalos más estrechos. Dado el alto nivel de precisión técnica proporcionado por los analizadores modernos, incluso las pequeñas diferencias en las mediciones sucesivas pueden ser significativas. Por lo tanto, es importante establecer y comprender los límites de las variaciones fisiológicas de las diversas pruebas. Los datos del recuento sanguíneo y los resultados de otras pruebas pueden proporcionar indicaciones sensibles de pequeñas anomalías que pueden tener su importancia

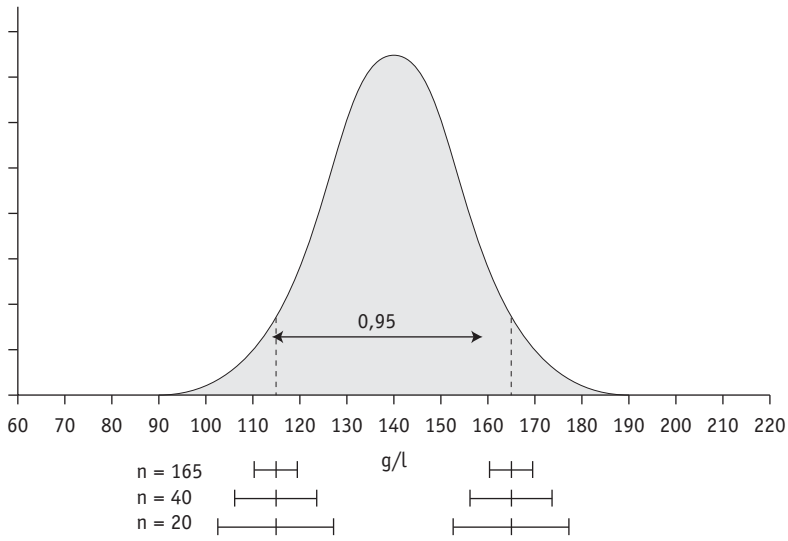


Figura 2.3. Efecto del tamaño de la muestra en los valores de referencia. Se obtuvo un gráfico de una distribución suavizada de las mediciones de hemoglobina en un grupo de mujeres normales; las ordenadas muestran la distribución de la frecuencia. El intervalo de referencia del 95% está definido por los límites de referencia inferior y superior, que son 115 y 165 g/l, respectivamente. Los niveles de confianza de estos valores se muestran para tres tamaños de muestra con valores de 20, 40 y 165, respectivamente.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 2.2. Valores hematológicos para adultos normales expresados como la media ±2 DE (rango del 95%)

Recuento de eritrocitos	
Hombres	$5{,}0 \pm 0{,}5 \times 10^{12}$/l
Mujeres	$4{,}3 \pm 0{,}5 \times 10^{12}$/l
Hemoglobina	
Hombres	150 ± 20 g/l
Mujeres	135 ± 15 g/l
Hematocrito (Hto)	
Hombres	0,45 ± 0,05 (l/l)
Mujeres	0,41 ± 0,05 (l/l)
Volumen corpuscular medio (VCM)	
Hombres y mujeres	92 ± 9 fl
Hemoglobina corpuscular media (HCM)	
Hombres y mujeres	29,5 ± 2,5 pg
Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM)	
Hombres y mujeres	330 ± 15 g/l
Amplitud de distribución eritrocitaria (ADE)	
Como coeficiente de variación (CV)	12,8 ± 1,2%
Como desviación estándar (DE)	42,8 ± 3,5 fl
Diámetro de los eritrocitos (valores medios)	
Películas procesadas en seco	6,7-7,7 mm
Densidad de los eritrocitos	1.092-1.100 g/l
Recuento de reticulocitos	$50\text{-}100 \times 10^9$/l (0,5-2,5%)
Recuento de leucocitos	$4{,}0\text{-}10{,}0 \times 10^9$/l
Recuento diferencial de leucocitos	
Neutrófilos	$2{,}0\text{–}7{,}0 \times 10^9$/l (40–80%)
Linfocitos	$1{,}0\text{–}3{,}0 \times 10^9$/l (20–40%)
Monocitos	$0{,}2\text{–}1{,}0 \times 10^9$/l (2–10%)
Eosinófilos	$0{,}02\text{–}0{,}5 \times 10^9$/l (1–6%)
Basófilos	$0{,}02\text{–}0{,}1 \times 10^9$/l (<1–2%)
Subtipos de linfocitos (aproximaciones a partir de rangos en datos publicados)	
CD3	$0{,}6\text{–}2{,}5 \times 10^9$/l (60–85%)
CD4	$0{,}4\text{–}1{,}5 \times 10^9$/l (30–50%)
CD8	$0{,}2\text{–}1{,}1 \times 10^9$/l (10–35%)
Cociente CD4:CD8	0,7–3,5
Recuento plaquetario	$280 \pm 130 \times 10^9$/l
Tiempo de sangría	
Método de Ivy	2–7 min
Método plantilla	2,5–9,5 min
Tiempo de protrombina	
Recombinante	11–16 s
Tromboplastina	10–12 s
Tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA)	30–40 s
Tiempo de trombina	15–19 s
Fibrinógeno plasmático	
Clauss	2,0–4,0 g/l
Coágulo seco	1,5–4,0 g/l
Determinación del fibrinógeno	≥128
Plasminógeno	0,75–1,60 u/ml
Tiempo de lisis de euglobulina	90–240 min
Antitrombina	0,75–1,25 u/ml
β-Tromboglobulina	<50 ng/ml
Factor plaquetario 4	<10 ng/ml
Proteína C	
Función	0,70–1,40 u/ml
Antígeno	0,61–1,32 u/ml
Proteína S	
Total	0,78–1,37 u/ml
Libre	0,68–1,52 u/ml
Actividad	
Hombres	0,60–1,35 u/ml
Mujeres	0,55–1,35 u/ml
Cofactor II de la heparina	0,55–1,45 u/ml
Mediana de la fragilidad osmótica eritrocitaria (FOE) (g/l NaCl)	
Sangre fresca	4,0–4,45 g/l NaCl
24 h a 37 °C	4,65–5,9 g/l NaCl
Título de aglutininas frías (4 °C)	<64
Volumen sanguíneo (normalizado al «peso ideal»)	
Volumen eritrocitario	
Hombres	30 ± 5 ml/kg
Mujeres	25 ± 5 ml/kg
Volumen plasmático	45 ± 5 ml/kg
Volumen plasmático total	70 ± 10 ml/kg
Período de vida de los eritrocitos	120 ± 30 días
Hierro sérico	
Hombres y mujeres	10–30 μmol/l (c 0,6–1,7 mg/l)
Capacidad total de fijación de hierro	47–70 μmol/l (c 2,5–4,0 mg/l)
Saturación de la transferrina	16–50%
Ferritina	
Hombres	15–300 μgl/l (media 100 μg/l)
Mujeres	15–200 μg/l (media 40 μgl/l)
Vitamina B_{12} en suero	180–640 ng/l
Folato en suero	3–20 μg/l (6,8–45 nmol/l)
Folato eritrocitario	160–640 μg/l (0,36–1,45 μmol/l)
Hemoglobina plasmática	10–40 mg/l
Haptoglobina sérica	
Inmunodifusión radial	0,8–2,7 g/l
Capacidad de unión de la hemoglobina	0,3–2,0 g/l

Tabla 2.2. Valores hematológicos para adultos normales expresados como la media ±2 DE (rango del 95%) *(cont.)*

Hb A_2	2,2–3,5%
Hb F	<1,0%
Metahemoglobina	<2,0%
Velocidad de sedimentación globular (mm en 1 h a 20 ± 3 °C)	
Hombres	
17–50 años	10 o <
51–60 años	12 o <
61–70 años	14 o <
>70 años	30 o <
Mujeres 17-50 años	12 o <
51–60 años	19 o <
61–70 años	20 o <
>70 años	35 o <
Viscosidad plasmática	
25 °C	1,50–1,72 mPa/s
37 °C	1,16–1,33 mPa/s

Tabla 2.3. Valores hematológicos para los lactantes normales (amalgama de datos derivados de varias fuentes; expresados como media ±2 DE o rango del 95%)[a]

	Nacimiento	Día 3	Día 7	Día 14	1 mes	2 meses	3-6 meses
Recuento eritrocitario (RE) × 10^{12}/l	6,0 ± 1,0	5,3 ± 1,3	5,1 ± 1,2	4,9 ± 1,3	4,2 ± 1,2	3,7 ± 0,6	4,7 ± 0,6
Hemoglobina g/l	180 ± 40	80 ± 30	175 ± 4	165 ± 4	140 ± 25	112 ± 18	126 ± 15
Hematocrito (Hto) l/l	0,60 ± 0,15	0,56 ± 0,11	0,54 ± 0,12	0,51 ± 0,2	0,43 ± 0,10	0,35 ± 0,07	0,35 ± 0,05
Volumen corpuscular medio (VCM) fl	110 ± 10	105 ± 13	107 ± 19	105 ± 19	104 ± 12	95 ± 8	76 ± 8
Hemoglobina corpuscular media (HCM) pg	34 ± 3	34 ± 3	34 ± 3	34 ± 3	33 ± 3	30 ± 3	27 ± 3
Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) g/l	330 ± 30	330 ± 40	330 ± 50	330 ± 50	330 ± 40	320 ± 35	330 ± 30
Reticulocitos × 10^9/l	120–400	50–350	50–100	50–100	20–60	30–50	40–100
Recuento de leucocitos x 10^9/l	18 ± 8	15 ± 8	14 ± 8	14 ± 8	12 ± 7	10 ± 5	12 ± 6
Neutrófilos × 10^9/l	4–14	3–5	3–6	3–7	3–9	1–5	1–6
Linfocitos × 10^9/l	3–8	2–8	3–9	3–9	3–16	4–10	4–12
Monocitos × 10^9/l	0,5–2,0	0,5–1,0	0,1–1,7	0,1–1,7	0,3–1,0	0,4–1,2	0,2–1,2
Eosinófilos x 10^9/l	0,1–1,0	0,1–2,0	0,1–0,8	0,1–0,9	0,2–1,0	0,1–1,0	0,1–1,0
Subtipos de linfocitos (× 10^9/l)[b]							
CD3		3,1–5,6				2,4–6,5	2,0–5,3
CD4		2,2–4,3				1,4–5,6	1,5–3,2
CD8		0,9–1,8				0,7–2,5	0,5–1,6
Cociente CD4/CD8		1,1–4,5				1,1–4,4	1,1–4,2
Plaquetas × 10^9/l	100–450	210–500	160–500	170–500	200–500	210–650	200–550

[a]Ha habido algunas notificaciones de recuentos leucocitarios y plaquetarios inferiores en las muestras de sangre venosa que en las de sangre capilar, aunque se mantienen dentro de estos intervalos de referencia. En un estudio la sangre venosa de un recién nacido dio valores inferiores que la sangre capilar para la hemoglobina, el RE y el recuento leucocitario; sin embargo, dio valores mayores para las plaquetas y los linfocitos[60].
[b]Aproximaciones dadas las amplias variaciones notificadas en diferentes estudios.

en la interpretación clínica y en los procesos de detección de patologías.

Obsérvese que en la tabla 2.2 el recuento leucocitario diferencial se muestra en porcentaje y en valores absolutos. Los analizadores automáticos proporcionan recuentos absolutos de cada tipo de leucocito y, dado que el recuento proporcional (porcentaje) tiene menos probabilidad de interpretar correctamente el aumento o la disminución en valores absolutos, el International Council for Standardization in Haematology recomienda que el recuento leucocitario diferencial se dé siempre como valor absoluto de cada tipo celular por unidad de volumen de sangre[12]. El cocien-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 2.4. Valores hematológicos para los niños normales (amalgama de datos derivados de varias fuentes; expresados como media ±2 DE o rango del 95%)

	1 año	2–6 años	6–12 años
Recuento eritrocitario x 10^{12}/l	4,5 ± 0,6	4,6 ± 0,6	4,6 ± 0,6
Hemoglobina g/l	126 ± 15	125 ± 15	135 ± 20
Hematocrito (Hto) l/l	0,34 ± 0,04	0,37 ± 0,03	0,40 ± 0,05
Volumen corpuscular medio (VCM) fl	78 ± 6	81 ± 6	86 ± 9
Hemoglobina corpuscular media (HCM) pg	27 ± 2	27 ± 3	29 ± 4
Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) g/l	340 ± 20	340 ± 30	340 ± 30
Reticulocitos × 10^9/l	30–100	30–100	30–100
Recuento de leucocitos × 10^9/l	11 ± 5	10 ± 5	9 ± 4
Neutrófilos × 10^9/l	1–7	1,5–8	2–8
Linfocitos × 10^9/l	3,5–11	6–9	1–5
Monocitos × 10^9/l	0,2–1,0	0,2–1,0	0,2–1,0
Eosinófilos × 10^9/l	0,1–1,0	0,1–1,0	0,1–1,0
Subtipos de linfocitos (×10^9/l)[a]			
CD3	1,5–5,4	1,6–4,2	0,9–2,5
CD4	1,0–3,6	0,9–2,9	0,5–1,5
CD8	0,6–2,2	0,6–2,0	0,4–1,2
Cociente CD4/CD8	1,0–3,0	0,9–2,7	1,0–3,0
Plaquetas × 10^9/l	200–550	200–490	170–450

[a]Aproximaciones dadas las amplias variaciones notificadas en diferentes estudios.

te neutrófilo:linfocito obtenido a partir de un recuento leucocitario diferencial debe ser contemplado únicamente como una aproximación.

VARIACIONES FISIOLÓGICAS EN EL RECUENTO SANGUÍNEO

Componentes de los eritrocitos

El recuento eritrocitario (RE) y la concentración de hemoglobina (Hb) presentan variaciones considerables en diferentes períodos de la vida. En el nacimiento, el valor de la hemoglobina es mayor que en cualquier otro período posterior (tabla 2.3). El RE está elevado inmediatamente tras el nacimiento[6,13] y, con frecuencia, se encuentran unos valores de hemoglobina mayores de 200 g/l, un RE mayor de 6,0 × 10^{12}/l y un hematocrito de 0,65 cuando el cordón umbilical se anuda tardíamente tras el alumbramiento. Probablemente, sea la interrupción de las pulsaciones en la arteria umbilical del cordón así como las contracciones uterinas lo que produce que mucha de la sangre contenida en la placenta ingrese de nuevo en la circulación del recién nacido. Tras el período posnatal inmediato, la Hb cae bastante abruptamente hasta alcanzar su valor mínimo alrededor del segundo mes (fig. 2.4). El RE y el Hto también caen, aunque de forma menos pronunciada, y las células pueden volverse microcíticas si aparece una deficiencia de hierro. En las tablas 2.3 y 2.4 se muestran los cambios en la hemoglobina corpuscular media (HCM), la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) y el volumen corpuscular medio (VCM) en la sangre del niño, desde la fase de recién nacido hasta la primera infancia pasando por la etapa de lactante.

La Hb y el RE aumentan normalmente de forma gradual hasta casi alcanzar los valores de los adultos en la pubertad[7]. Sin embargo, en una encuesta sanitaria realizada en hombres y mujeres aparentemente normales en Gran Bretaña, se notificaron valores medios de hemoglobina de 145 g/l para los hombres y de 128 g/l para las mujeres[9]; los límites normales inferiores de la hemoglobina (es decir, 2 DE por debajo de la media) se toman habitualmente como 130 y 120 g/l respectivamente, pero en algunos hombres y mujeres aparentemente normales se observaron límites inferiores de 120 y 110 g/l respectivamente. Estadísticamente, al menos el 1% de la población normal tiene niveles 3 DE por debajo de la media, pero en algunos estudios se han encontrado cifras considerablemente mayores[9]. Es posible que algunos tengan deficiencias nutricionales,

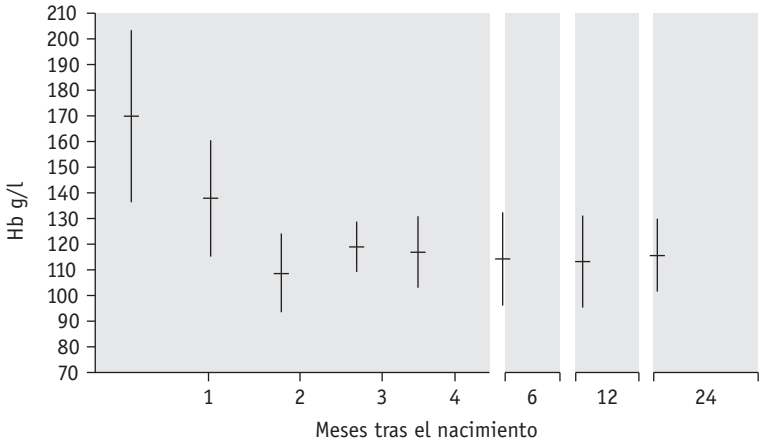


Figura 2.4. Cambios en los valores de hemoglobina en los primeros 2 años tras el nacimiento. Las líneas perpendiculares muestran las medias y los intervalos a 2 DE.

sobre todo de hierro, sin efectos clínicos. Los valores de las mujeres tienden a ser significativamente menores que los de los hombres[9,14]. Aparte de la influencia hormonal en la hemopoyesis, es probable que la deficiencia de hierro sea un factor que influya en esa diferencia; se desconoce en qué medida la pérdida menstrual de sangre se convierte en un elemento significativo, porque una pérdida de hasta 100 ml de sangre en cada período puede producir una depleción de hierro a pesar de que no haya anemia[15,16]. Además, la detención de la menstruación por los anticonceptivos orales ocasiona un aumento del hierro sérico sin que se afecten los valores de la hemoglobina[17]. Puede haber diferencias étnicas. En una importante investigación sanitaria nacional llevada a cabo en los Estados Unidos durante un período de 6 años, se demostró que, en poblaciones socialmente comparables, los niveles de hemoglobina en los negros americanos son 5-10 g/l inferiores a los de sus homólogos blancos en todas las edades, y hasta 20 g/l inferiores en los 2 primeros años de vida[18].

Embarazo

En el embarazo normal, hay un incremento de la actividad eritropoyética[19]. Sin embargo, al mismo tiempo se produce un aumento en el volumen plasmático[20,21], que tiene como consecuencia una disminución progresiva de los valores de hemoglobina, Hto y RE (tabla 2.5). Los valores regresan a la normalidad a la semana aproximadamente del parto. Hay un ligero aumento en el VCM durante el segundo trimestre[22]. La ferritina sérica disminuye al principio del embarazo y permanece baja en general durante el mismo, incluso si se administra hierro suplementario[23], aunque la reducción en la hemoglobina es menos marcada.

Tercera edad

En los hombres y mujeres sanos, la hemoglobina, el RE, el Hto y los parámetros relacionados se mantienen marcadamente constantes hasta la sexta década. No obstante, el envejecimiento es un proceso gradual, cuyo comienzo es arbitrario. En muchos estudios se asume que empieza a los 65 años; sin embargo la anemia es más habitual en los mayores de 70-75 años[24-26]. Es menos marcada en las mujeres que en los hombres, de forma que una diferencia de 20 g/l en los grupos más jóvenes se reduce a 10 g/l o menos en la tercera edad. Hay un aumento concomitante del hierro sérico, aunque los valores de ferritina sérica se mantienen más elevados en los hombres que en las mujeres. Entre los factores que pueden justificar este valor más bajo de la hemoglobina en los ancianos, se encuentran las reservas eritropoyéticas disminuidas con reducción de los progenitores eritroides en la médula ósea, la deficiencia de cobalamina y la enfermedad inflamatoria crónica o la pérdida sanguínea crónica (que a menudo se pasa por alto)[24,25]. Nunca se debe atribuir una anemia moderada o grave al envejecimiento *per se*, a menos que se haya descartado cualquier enfermedad subyacente; sin embargo, un número significativo de ancianos con anemia no presentan una causa clínica o nutricional identificable.

Cambios transitorios

Además de los efectos permanentes de la edad y del sexo, también parece haber fluctuaciones transitorias, cuyo significado es, a menudo, difícil de valorar.

Ejercicio físico

No está claro si el ejercicio ligero aumenta el RE o la hemoglobina de forma significativa por encima de los valo-

Tabla 2.5. Valores de la hemoglobina en el embarazo

1.er trimestre	124-135 g/l
2.º trimestre	110-117 g/l
3.er trimestre	106-109 g/l[a]
Valores medios posparto	
Día 2	104 g/l
Semana 1	107 g/l
Semana 3	116 g/l
Mes 2	119 g/l

[a]Se pueden encontrar valores normales (120 g/l o superiores) cuando se administra hierro suplementario.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

res basales observados en el sujeto en reposo; los efectos pueden ser lo suficientemente pequeños para quedar incluidos en los errores técnicos de cálculo. Los cambios más significativos se producen en los atletas de resistencia; por ejemplo, los corredores de distancias largas que pueden desarrollar la, así denominada, «anemia del deportista» con una ligera disminución de los valores de hemoglobina y del RE, que se cree son el resultado de un aumento del volumen plasmático[27,28]. En cambio, en los velocistas que requieren una breve e intensa actividad muscular sumamente explosiva, el RE aumenta en 0,5 × 10^{12}/l y la hemoglobina en 15 g/l, sobre todo por la reducción en el volumen plasmático y, en menor medida, por la reentrada en la circulación de las células previamente secuestradas en el bazo[29]. Éste es un suceso transitorio que se produce en los atletas inmediatamente después de una carrera, mientras que en el resto de las ocasiones no hay diferencias significativas en los valores de hemoglobina y de Hto entre estos atletas y los sujetos de control que no son atletas; esto es algo que se debe tener en cuenta al comprobar los efectos del «dopaje» en los deportistas[30,31]. Durante el entrenamiento de resistencia, se produce una disminución de los valores de hierro sérico y de ferritina, posiblemente asociada a la pérdida de hierro a través del sudor[32]. Hay que distinguir estos efectos producidos por el ejercicio de los que ocasiona una forma de hemólisis conocida como la «anemia del corredor» o «hemoglobinuria de la marcha», que se origina como resultado del golpeteo de los pies en el suelo[33].

Posición

Existe una alteración pequeña, aunque significativa, en el volumen plasmático, con un aumento de la hemoglobina y del Hto, cuando el paciente cambia de postura y pasa de estar acostado a estar sentado, especialmente en las mujeres[34]; en sentido contrario, el cambio de estar paseando a estar acostado ocasiona una reducción del 5-10% en la Hb y en el Hto. Por tanto, los sujetos deben descansar durante 5-10 min antes de que se les extraiga la sangre. La diferencia en la posición del brazo durante la toma de muestra venosa, ya sea por debajo de la aurícula o a su nivel, también pueden afectar al Hto.

Estos aspectos subrayan la importancia de utilizar un método estandarizado para la recogida de la sangre. Este punto se analiza en el capítulo 1 y las diferencias entre la sangre venosa y la capilar se describen en la página 4.

Variación diurna y estacional

Las variaciones en la Hb y en el RE durante el transcurso del día son por lo general pequeñas, alrededor del 3%, y los cambios en el VCM y en la HCM, insignificantes. Sin embargo, en los reticulocitos se produce una variación del 20%[8]. La eritropoyetina del suero presenta una variación diurna notable, siendo mínima a las 08:00, e incrementándose en un 40% a las 16:00 y en un 60% a las 20:00[35]. En el hierro sérico y en la ferritina se observan también variaciones diurnas pronunciadas aunque variables[36,37]. Dado que estas fluctuaciones se producen también en pacientes que toman suplementos con contenido férrico, hay que tener este hecho en cuenta para establecer el momento de la recogida de la muestra[37]. Se ha sugerido la existencia de variaciones estacionales más pequeñas, pero la evidencia de las mismas es contradictoria[38-40].

Altitud

El efecto de la altitud consiste en producir un aumento de la Hb y del Hto, así como del número de eritrocitos circulantes, que tienen un VCM inferior. El grado de la policitemia depende del de hipoxemia[41]. A una altitud de 2.000 m, la concentración de la hemoglobina es de 8 a 10 g/l y el Hto es 0,025 mayor que a nivel del mar; a 3.000 m, la concentración de la hemoglobina es de 20 g/l y el Hto es 0,060 superior, y a 4.000 m la concentración de la hemoglobina es de 35 g/l y el Hto es 0,110 superior. En las alturas intermedias y mayores se presentan los aumentos correspondientes[42]. Estos incrementos parecen ser el resultado tanto de un aumento de la eritropoyesis por el estímulo hipóxico como de la reducción en el volumen plasmático que se produce en las grandes altitudes.

Tabaquismo

El humo del cigarrillo afecta a la Hb, el RE, el Hto y el VCM (v. pág. 19).

Recuento leucocitario

El efecto de la edad se indica en las tablas 2.2, 2.3 y 2.4; en el nacimiento, el recuento leucocitario total es elevado; hay predominio de los neutrófilos, que alcanzan una concentración máxima de 13,0 × 10^9/l a las 12 h, para después caer hasta un recuento de 4,0 × 10^9/l en las siguientes semanas y posteriormente continuar hasta unos valores en los que el recuento permanece estable. Los linfocitos disminuyen durante los 3 primeros días de vida, a menudo hasta un valor tan bajo como 2,0-2,5 × 10^9/l, para después subir hasta el décimo día; desde ese momento, son las células predominantes (cerca del 60%) hasta llegar al quinto o séptimo año en que dan paso a los neutrófilos. A partir de esa edad en adelante, los valores son los mismos que para los adultos[7]. Hay también ligeras diferencias relativas al sexo; el recuento leucocitario total y el recuento de neutrófilos pueden ser ligeramente mayores en las niñas que en los niños[7] y en las mujeres que en los hombres[43]. Después de la menopausia, el recuento disminuye en las mujeres, con tendencia a ser inferior al de los hombres de edad similar[15,43].

Hay diferencias considerables en los recuentos leucocitarios de las distintas personas. Algunas tienden a mantener un valor relativamente constante durante largos períodos de tiempo; otras tienen recuentos que pueden variar hasta en un 100% en momentos diferentes. En algunos sujetos, parece seguir un ritmo determinado, presentándose en ciclos de 14 a 23 días; en las mujeres este hecho puede tener relación hasta cierto punto con el ciclo menstrual. Se ha notificado que algunas formas de anticoncepción oral elevan el recuento leucocitario[43]. No existe una variación

diurna clara, pero los recuentos mínimos son habituales por la mañana con el sujeto en reposo y a lo largo del día puede haber diferencias de un 14% para el recuento leucocitario total, un 10% para los neutrófilos, un 14% para los linfocitos y un 20% para los eosinófilos[8]; en algunos casos esto puede dar lugar a una inversión del cociente neutrófilo:linfocito. La actividad física puede elevar ligeramente el recuento; el ejercicio intenso origina aumentos de hasta 30 × 10^9/l, debidos, principalmente, a la reducción del flujo sanguíneo esplénico, que origina una disminución en el depósito de neutrófilos en el bazo, y, hasta cierto punto, a la liberación al torrente sanguíneo de los neutrófilos secuestrados previamente en los capilares cerrados y en el bazo[44]. También durante el ejercicio intenso se produce la entrada en el torrente sanguíneo de grandes cantidades de linfocitos y de monocitos. Sin embargo, también se han notificado casos de neutropenia y de linfopenia en atletas sometidos a sesiones diarias de entrenamiento[45,46].

La inyección de adrenalina (epinefrina) produce un aumento del recuento leucocitario; el aumento es en las cifras de todos los tipos principales de leucocitos (y de plaquetas), reflejando posiblemente la amplitud del depósito de las células sanguíneas maduras, presentes, no solamente en la médula ósea y en el bazo, sino también en otros tejidos y órganos del cuerpo. De forma similar, es posible que la emoción pueda originar un aumento en el recuento leucocitario. En los adultos con estrés o con traumatismo físico se produce una linfocitosis transitoria con una inversión del cociente neutrófilo:linfocito[47]. Lo mismo puede ocurrir en los pacientes cuando acuden al médico. Se desconoce el efecto de la ingestión de comida. El fumar cigarrillos tiene efecto sobre el recuento leucocitario.

Una leucocitosis moderada de hasta 15 × 10^9/l es habitual durante el embarazo, debido a una neutrofilia, con un valor máximo en el segundo trimestre[22]. El recuento regresa a valores normales aproximadamente a la semana después del parto[48].

El entorno puede influir sobre el recuento leucocitario. Así, en el África tropical se observa una tendencia a la inversión del cociente neutrófilo:linfocito en individuos con un recuento leucocitario total bajo[49]. Este hecho puede deberse en parte a las enfermedades parasitarias y protozoarias endémicas; sin embargo, es probable que la genética desempeñe también un papel, ya que se han observado recuentos leucocitarios significativamente reducidos, sobre todo recuentos de neutrófilos, en los africanos que viven en Gran Bretaña[50]. En algunas áreas tropicales, la eosinofilia o la monocitosis reactiva son tan habituales que se las contempla como un valor de referencia (¿normal?) para esa población. Las personas ancianas que se vacunan de la gripe tienen un menor recuento leucocitario total debido a una reducción en el número de linfocitos[51].

Recuento plaquetario

Existe una ligera variación diurna de aproximadamente un 5%[8]; ésta se produce durante el transcurso del día así como de un día a otro. Dentro del amplio intervalo de referencia normal, se encuentran algunas diferencias étnicas y, en los indios del oeste y en los africanos sanos, los recuentos plaquetarios pueden ser por término medio un 10-20% inferiores a los de los europeos que viven en el mismo entorno[52]. Puede haber una diferencia entre géneros; así, se ha notificado que, en las mujeres, el recuento plaquetario es un 20% mayor que en los hombres[53]. Una reducción en el recuento plaquetario puede producirse en las mujeres en el momento de la menstruación. No hay diferencias evidentes relacionadas con la edad; sin embargo, en el primer año tras el nacimiento, el recuento plaquetario tiende a estar en el valor máximo del intervalo de referencia normal en el adulto. El ejercicio intenso produce un aumento del 30-40% en el recuento plaquetario[44]; el mecanismo es similar al que se produce con los leucocitos.

Otros componentes sanguíneos

Como en el caso del recuento sanguíneo, se producen variaciones en los valores normales de referencia dependiendo del género, la edad, el estrés, la fluctuación diurna, etc. Estas variaciones se describen en los capítulos pertinentes.

Efectos del tabaquismo

El hecho de fumar cigarrillos tiene un efecto significativo sobre muchos valores hematológicos normales de referencia[54]. Algunos efectos pueden ser transitorios y su gravedad difiere según los individuos y según el número de cigarrillos fumados. El hecho de fumar 10 o más cigarrillos al día produce unos valores de Hb, Hto y VCM ligeramente superiores[40,55]. Es probable que esto sea una consecuencia de la acumulación de carboxihemoglobina en la sangre junto con una reducción del volumen plasmático. Después de fumar un único cigarrillo, el valor de la carboxihemoglobina aumenta en cerca del 1%[56], y en los fumadores importantes la carboxihemoglobina puede representar el 4-5% de la concentración de Hb total. Puede haber policitemia[57].

El recuento leucocitario está elevado, sobre todo como resultado de un incremento de los neutrófilos, y la funcionalidad de éstos puede estar afectada[14,54,58]. También se afectan los linfocitos con un aumento de los CD4-positivos y del recuento linfocitario total[54,58,59].

Los fumadores tienden a presentar recuentos plaquetarios mayores que los no fumadores, pero éstos disminuyen rápidamente al cesar de fumar[54]. Los estudios sobre la agregación plaquetaria y la adhesividad han dado resultados equívocos, pero parece ser que existe un aumento consistente en el recambio plaquetario con una reducción de la supervivencia plaquetaria y un aumento de la β-tromboglobulina plasmática. Se ha notificado una concentración elevada de fibrinógeno (con un aumento de la viscosidad plasmática) y una reducción de la proteína S, pero el tabaquismo no parece tener ningún efecto permanente sobre el sistema fibrinolítico[54].

La influencia del tabaquismo sobre la sangre se resume en la tabla 2.6.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 2.6. Efectos del tabaquismo[a,54-59]

Aumento	Disminución
Hemoglobina (Hb)	Volumen plasmático
Recuento eritrocitario (RE)	Proteína S
Hematocrito (Hto)	
Volumen corpuscular medio (VCM)	
Hemoglobina corpuscular media (HCM)	
Recuento de leucocitos	
Recuento de neutrófilos	
Recuento de linfocitos	
Linfocitos T (CD4-positivos)	
Recuento de monocitos	
Carboxihemoglobina (>2%)	
Recuento plaquetario (transitorio)	
Volumen plaquetario medio	
Fibrinógeno	
β-Tromboglobulina	
Factor von Willebrand	
Masa eritrocitaria	
Haptoglobinas	
Viscosidad plasmática	
Viscosidad de la sangre completa	
Velocidad de sedimentación globular (VSG)	

[a]La amplitud de la variación de los valores de referencia normales es diferente según los individuos y la cantidad de cigarrillos fumados; algunos de los efectos pueden producirse únicamente mientras se fuma o inmediatamente después de hacerlo. Algunos efectos pueden ser transitorios y su gravedad varía según los individuos y según el número de cigarrillos fumados.

BIBLIOGRAFÍA

1. International Committee for Standardization in Haematology 1981 The theory of reference values. Clinical and Laboratory Haematology 3:369-373.
2. International Federation of Clinical Chemistry and International Council for Standardization in Haematology 1987 The theory of reference values Part 6: Presentation of observed values related to reference values. Journal of Clinical Biochemistry 25:657-662.
3. International Committee for Standardization in Haematology 1982 Standardization of blood specimen collection procedures for reference values. Clinical and Laboratory Haematology 4:83-86.
4. Tukey JW 1977 Exploratory data analysis. Addison-Wesley, Reading MA.
5. International Federation of Clinical Chemistry and International Council for Standardization in Haematology 1987 The theory of reference values Part 5: Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry 25:645-656.
6. Lilleyman JS, Hann IM, Blanchette VS 1999 Pediatric hematology, 2nd ed., Churchill Livingstone, London.
7. Taylor MRH, Holland CV, Spencer R, et al 1997 Haematological reference ranges for school children. Clinical and Laboratory Haematology 19:1-15.
8. Richardson Jones A, Twedt D, Swaim W, et al 1996 Diurnal change of blood count analytes in normal subjects. American Journal of Clinical Pathology 106:723-727.
9. White A, Nicolaas G, Foster K, et al 1991 Health Survey for England: Office of population census and surveys—Social Survey Division. HMSO, London.
10. Bellamy GJ, Hinchliffe RF, Crawshaw KC 2000 Total and differential leucocyte counts in infants at 2, 5 and 13 months of age. Clinical and Laboratory Haematology 22:81-87.
11. Handin RI, Lux SE, Stossel TP 2003 Blood—Principles and Practice of Hematology, 2nd ed., p. 2219. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
12. International Council for Standardization in Haematology: Expert Panel on Cytometry 1995 Recommendation of the International Council for Standardization in Haematology on reporting differential leucocyte counts. Clinical and Laboratory Haematology 17:113.
13. Özbek N, Gürakan B, Kayiran SM 2000 Complete blood cell counts in capillary and venous blood of healthy term newborns. Acta Haematologica 103:226-228.
14. Helman N, Rubenstein LS 1975 The effects of age, sex and smoking on erythrocytes and leukocytes. American Journal of Clinical Pathology 63:35-44.
15. Cruickshank JM, Alexander MK 1970 The effect of age, parity, haemoglobin level and oral contraceptive preparations on the normal leucocyte count. British Journal of Haematology 18:541.
16. Hallberg L, Hogdahl AM, Nilsson L, et al 1966 Menstrual blood loss and iron deficiency. Acta Medica Scandinavica 180:639-650.
17. Burton JL 1967 Effect of oral contraceptives on haemoglobin, packed cell volume, serum-iron and total iron-binding capacity in healthy women. Lancet 1:978-980.
18. Houwen B, van Assendelft OW 2002 Haemoglobinometry: screening and routine practice. In: Rowan RM, van Assendelft OW, Preston FE (eds) Advanced Laboratory Methods in Haematology, pp 182-190, Arnold, London.
19. McMullin MF, White R, LappinT, et al 2003 Haemoglobin during pregnancy: relationship to erythropoietin and haematinic status. European Journal of Haematology 71:44-50.
20. Chesley LC 1972 Plasma and red cell volumes during pregnancy. American Journal of Obstetrics and Gynecology 112:440-450.
21. Large RD, Dynesius R 1973 Blood volume changes during normal pregnancy. Clinics in Haematology 2:433-451.
22. Balloch AJ, Cauchi MN 1993 Reference ranges for haematology parameters in pregnancy derived from patient populations. Clinical and Laboratory Haematology 15:7-14.
23. Howells MR, Jones SE, Napier JAF, et al 1986 Erythropoiesis in pregnancy. British Journal of Haematology 64:595-599.
24. Carmel R 2001 Anemia and aging: an overview of clinical, diagnostic and biological issues. Blood Reviews 15:9-18.
25. Nilsson-Ehle H, Jagenburg R, Landahl S, et al 2000 Blood haemoglobin declines in the elderly: implications for reference intervals from age 70 to 85. European Journal of Haematology 65:297-305.
26. Mattila KS, Kuusela V, Pelliniemi TT, et al 1986 Haematological laboratory findings in the elderly; influence of age and sex. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation 46:411-415.
27. Smith JA 1995 Exercise, training and red blood cell turnover. Sports Medicine 19:9-31.
28. Green HJ, Sutton JR, Coates G, et al 1991 Response of red cell and plasma volume to prolonged training in humans. Journal of Applied Physiology 70:1810-1815.

29. Allsop P, Peters AM, Arnot RN, et al 1992 Intrasplenic blood cell kinetics in man before and after brief maximal exercise. Clinical Science 83:47-54.
30. Marx JJM, Vergouwen PCJ 1998 Packed-cell volume in elite athletes. Lancet 352:451-452.
31. Lippi G, Franchini M, Guidi G 2002 Haematocrit measurement and antidoping policies. Clinical and Laboratory Haematology 24:65-66.
32. Cook JD 1994 The effect of endurance training on iron metabolism. Seminars in Hematology 31:146-154.
33. Davidson RJL 1964 March or exertional haemoglobinuria. Seminars in Haematology 6:150-161.
34. Felding P, Tryding N, Hyltoft Petersen P, et al 1980 Effects of posture on concentration of blood constituents in healthy adults: practical application of blood specimen collection procedures recommended by the Scandinavian Committee on Reference Values. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation 40:615-621.
35. Wide L, Bengtsson C, Birgegård G 1989 Circadian rhythm of erythropoietin in human serum. British Journal of Haematology 72:85-90.
36. Romslo I, Talstad I 1988 Day-to-day variations in serum iron, serum iron binding capacity, serum ferritin and erythrocyte protoporphyrin concentration in anaemic subjects. European Journal of Haematology 40:79.
37. Dale JC, Burritt MF, Zinsmeister AR 2002 Diurnal variation of serum iron, iron-binding capacity, transferrin saturation and ferritin levels. American Journal of Clinical Pathology 117:802-808.
38. Costongs GMPJ, Janson PCW, Bas BM, et al 1985 Short-term and long-term intra-individual variations and critical differences of haematological laboratory parameters. Journal of Clinical Chemistry and Biochemistry 23:69-76.
39. Ross DW, Ayscue LH, Watson J, et al 1988 Stability of hematologic parameters in healthy subjects: intraindividual versus interindividual variation. American Journal of Clinical Pathology 90:262-267.
40. Kristal-Boneh E, Froom P, Harari G, et al 1997 Seasonal differences in blood cell parameters and the association with cigarette smoking. Clinical and Laboratory Haematology 19:177-181
41. Ruiz-Arguelles GJ, Sanchez-Medal L, Loria A, et al 1980 Red cell indices in normal adults residing at altitudes from sea level to 2670 meters. American Journal of Hematology 8:265-271.
42. Myhre LD, Dill DB, Hall FG, et al 1970 Blood volume changes during three week residence at high altitude. Clinical Chemistry 16:7-14.
43. England JM, Bain BJ 1976 Total and differential leucocyte count. British Journal of Haematology 33:1-7.
44. Allsop P, Arnot R, Gwilliam M et al 1988 Does splenic autotransfusion occur during high intensity cycle exercise in man. Journal of Physiology (London) 407:24P
45. Watson HG, Meiklejohn DJ 2001 Leucopenia in professional football players. British Journal of Haematology 112:824-827.
46. Bain BJ, Philllips D, Thomson K, et al 2000 Investigation of the effect of marathon running on leucocyte counts of subjects of different ethnic origins: relevance to the aetiology of ethnic neutropenia. British Journal of Haematology 108:483-487.
47. Karandikar NJ, Hotchkiss EC, McKenna RW 2002 Transient stress lymphocytosis: an immunophenotypic characterization of the most common cause of newly identified adult lymphocytosis in a tertiary hospital. American Journal of Clinical Pathology 117:819-825.
48. Cruickshank JM 1970 The effects of parity on the leucocyte count in pregnant and non-pregnant women. British Journal of Haematology 18:531-540.
49. Woodliff HJ, Kataaha PK, Tibaleka AK, et al 1972 Total leucocyte count in Africans. Lancet 2:875.
50. Bain BJ, Seed M, Godsland I 1984 Normal values for peripheral blood white cell counts in women of four different ethnic origins. Journal of Clinical Pathology 37: 188-193.
51. Cummins D, Wilson ME, Foulger KJ, et al 1998 Haematological changes associated with influenza vaccination in people aged over 65: case report and prospective study. Clinical and Laboratory Haematology 20:285-287.
52. Bain BJ, Seed M 1986 Platelet count and platelet size in healthy Africans and West Indians. Clinical and Laboratory Haematology 8:43-48.
53. Stevens RF, Alexander MK 1977 A sex difference in the platelet count. British Journal of Haematology 37:295-300.
54. Bain BJ 1992 The haematological effects of smoking. Journal of Smoking-related Diseases 3:99-108.
55. Whitehead TP, Robinson D, Allaway SL, et al 1995 The effects of cigarette smoking and alcohol consumption on blood haemoglobin, erythrocytes and leucocytes: a dose related study on male subjects. Clinical and Laboratory Haematology 17:131-138.
56. Russell MA, Wilson C, Cole PV, et al 1973 Comparison of increases in carboxyhaemoglobin after smoking “extramild” and “non mild” cigarettes. Lancet 2:687-690.
57. Smith JR, Landaw SA 1978 Smoker’s polycythemia. New England Journal of Medicine 298:6-10.
58. Parry H, Cohen S, Schlarb J 1997 Smoking, alcohol consumption and leukocyte counts. American Journal of Clinical Pathology 107:64-67.
59. Bain BJ, Rothwell M, Feher MD et al 1992 Acute changes in haematological parameters on cessation of smoking. Journal of the Royal Society of Medicine 85:80-82.
60. Kayiran SM, Özbek N, Turan M, et al 2003 Significant differences between capillary and venous complete blood counts in the neonatal period. Clinical and Laboratory Haematology 25:9-16.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

3 Técnicas hematológicas básicas

Barbara J. Bain, S. Mitchell Lewis e Imelda Bates

Hemoglobinometría 24
Medición de la concentración de hemoglobina utilizando un espectrómetro (espectrofotómetro) o un colorímetro fotoeléctrico 24
Método del cianuro de hemoglobina (cianmetahemoglobina) 24
Diluyente 25
Patrón de referencia de la cianmetahemoglobina 25
Método 25
Cálculo de la concentración de hemoglobina 26
Método de la oxihemoglobina 26
Método 27
Patrón 27
Espectrometría directa 27
Hemoglobinómetros portátiles de lectura directa 27
Comparadores de color 27
Hemoglobinómetros portátiles 27
Pruebas de detección no invasivas 28
Intervalo normal de la hemoglobina 28
Volumen del paquete de hematíes o hematocrito 28
Método del microhematocrito 28
Precisión del microhematocrito 28
Método de referencia del ICSH 29
Método de referencia alternativo 29
Intervalo normal del hematocrito 30
Recuentos manuales de células e índices eritrocitarios 30
Intervalo normal de la CHCM 30
Recuentos de basófilos y de eosinófilos 30
Intervalo normal del recuento de eosinófilos 30
Intervalo normal del recuento de basófilos 30
Recuento manual del diferencial de leucocitos 30
Método 31
Informe del recuento diferencial de leucocitos 32
Recuento diferencial de referencia de leucocitos 32
Intervalo normal del recuento diferencial de leucocitos 32
Recuento plaquetario 32
Recuento de reticulocitos 32
Tinción de reticulocitos 34
Soluciones de tinción 34
Método 34
Recuento de reticulocitos 34
Métodos de fluorescencia para realizar un recuento reticulocitario 35
Método de referencia manual 35
Intervalo normal del recuento de reticulocitos 36
Técnicas automatizadas de recuento sanguíneo 36
Concentración de hemoglobina 37
Recuento de eritrocitos 37
Sistemas de recuento de hematíes 37
Recuento por impedancia 37
Dispersión lumínica 37
Fiabilidad de los contadores electrónicos 37
Determinación de los umbrales de discriminación 38
Hematocrito y volumen corpuscular medio 39
Índices eritrocitarios 40
Volumen corpuscular medio 40
Hemoglobina corpuscular media y concentración de la hemoglobina corpuscular media 40
Variaciones en los volúmenes eritrocitarios: amplitud de la distribución eritrocitaria 41
Variaciones en la hemoglobinización eritrocitaria: amplitud de la distribución de la hemoglobina 41
Recuento leucocitario total 41
Recuento diferencial automatizado 42
Nuevos parámetros leucocitarios 43
Gráficos de los instrumentos automatizados 43
Recuento plaquetario 44
Recuento plaquetario normal 45
Volumen plaquetario medio 45
Recuento de reticulocitos 45
Fracción de reticulocitos inmaduros 46
Recuento normal de reticulocitos 46
Calibración de los contadores automatizados de células sanguíneas 46
Alarmas en los recuentos sanguíneos automatizados 47

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

La determinación de los diversos componentes del hemograma completo puede realizarse con técnicas manuales, semiautomatizadas o automatizadas. Las técnicas manuales tienen, por lo general, un bajo coste en lo relativo al equipamiento y a los reactivos pero requieren mucha mano de obra; las técnicas automatizadas representan altos costes de capital pero permiten la realización rápida de un gran número de recuentos sanguíneos con un número menor de trabajadores en el laboratorio. Las técnicas automatizadas son más precisas, pero su exactitud depende de la calibración correcta y del uso de reactivos que son, generalmente, específicos de ese analizador en particular. Hoy en día muchos laboratorios utilizan exclusivamente técnicas automatizadas; sin embargo, ciertas técnicas manuales son necesarias como referencia para la estandarización de los métodos. Los métodos manuales se necesitan también para trabajar con muestras que presentan características inusuales y que pueden dar resultados discrepantes con los analizadores automatizados.

Todas las pruebas analizadas en este capítulo pueden realizarse en sangre venosa o recogida de los capilares y anticoagulada con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (v. pág. 5). Es esencial una mezcla cuidadosa del espécimen sanguíneo antes del análisis para que los resultados de la prueba sean exactos. Idealmente, las pruebas deben realizarse antes de las 6 h de haber obtenido el espécimen sanguíneo, porque algunos resultados se alteran con períodos mayores de almacenamiento. No obstante, se pueden obtener resultados, con suficiente fiabilidad para los fines clínicos, de la sangre almacenada hasta 24 h a 4 °C (v. pág. 6).

HEMOGLOBINOMETRÍA

La concentración de hemoglobina (Hb) de una solución puede calcularse por medición de su color, de su poder de combinación con el oxígeno o con el monóxido de carbono o por su contenido en hierro. Los métodos que describimos se basan en técnicas que comparan la intensidad de la luz o del color y que miden también, en grado variable, cualquier cantidad de metahemoglobina (Hi) o de sulfahemoglobina (SHb) que pueda haber presente. La capacidad de la sangre para combinar oxígeno es de 1,34 ml de O_2 por gramo de hemoglobina. De forma ideal, para valorar una anemia *clínica*, se debe realizar una estimación funcional del valor de Hb midiendo la capacidad de combinar oxígeno, pero esto es muy poco práctico en el laboratorio hematológico de rutina. Los resultados que da son al menos un 2% inferiores a los obtenidos por otros métodos, probablemente por la presencia constante de una pequeña proporción de pigmento inerte. El contenido en hierro de la hemoglobina puede calcularse de forma exacta[1] pero, una vez más, el método no es factible en la práctica rutinaria. Generalmente, se considera que los cálculos basados en el contenido en hierro se aproximan más a los valores reales, pero incluyen el hierro unido al pigmento inactivo. El contenido en hierro se convierte en hemoglobina asumiendo la veracidad de la siguiente relación: 0,347 g hierro = 100 g hemoglobina[2].

MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE HEMOGLOBINA UTILIZANDO UN ESPECTRÓMETRO (ESPECTROFOTÓMETRO) O COLORÍMETRO FOTOELÉCTRICO

Dos son los métodos de uso habitual: *a)* el método del cianuro de hemoglobina (HiCN; cianmetahemoglobina), y *b)* el método de la oxihemoglobina (HbO_2). Hay poca diferencia en cuanto a la precisión entre ambos métodos, aunque la disponibilidad de una preparación de referencia estable y fiable es una de las ventajas principales del método de la HiCN.

A pesar de que el reactivo de la HiCN contiene cianuro, sólo hay 50 mg de cianuro de potasio por litro y habría que ingerir de 600 a 1.000 ml para que produjera efectos graves. Sin embargo, el uso del cianuro de potasio se ha considerado un riesgo potencial; por eso, se han propuesto reactivos alternativos inocuos como la azida sódica[3] y el lauril sulfato sódico[4,5], que convierten la hemoglobina en azidahemoglobina y en sulfato de hemoglobina respectivamente. Se utilizan en algunos sistemas automatizados, pero no hay patrones estables disponibles y son también sustancias tóxicas que deben manejarse con cuidado.

Otros métodos empleados son el de la hematina ácida de Sahli, que es menos preciso porque la aparición del color es lenta, es inestable y comienza a desvanecerse casi inmediatamente después de que alcance su valor máximo. El método de la hematina alcalina da un cálculo real de la Hb total incluso en presencia de carboxihemoglobina (HbCO), Hi o SHb; las proteínas y los lípidos del plasma tienen poco efecto sobre la aparición del color, aunque causan turbidez. El método original era más engorroso y menos preciso que los métodos de la HiCN o de la HbO_2; sin embargo, se ha desarrollado un método modificado en el que se diluye la sangre en una solución alcalina con un detergente no iónico y se lee en un espectrómetro con una absorbancia de 575 nm frente a una solución estándar de cloruro de hemina[6,7]. En una evaluación se han obtenido resultados alentadores[8], aunque otro estudio ha mostrado un sesgo del 2,6% al compararlo con el método de referencia, sin que haya una relación lineal entre la concentración de hemoglobina y la absorbancia a valores altos y bajos de la hemoglobina[9].

MÉTODO DEL CIANURO DE HEMOGLOBINA (CIANMETAHEMOGLOBINA)

El método del cianuro de hemoglobina (cianmetahemoglobina) es el método internacionalmente recomendado para la determinación de la concentración sanguínea de hemoglobina[2,a]. La base del método consiste en la dilución de

[a] En algunos países ya no se dispone de reactivos con cianuro.

sangre en una solución que contiene cianuro y ferrocianuro potásicos. La hemoglobina, la Hi y la HbCO, pero no la SHb, se convierten en HiCN. La absorbancia de la solución se mide con un espectrómetro a una longitud de onda de 540 nm o con un colorímetro fotoeléctrico con un filtro amarillo-verde (p. ej., Ilford 625, Wratten 74, Chance 0 Gr1).

Diluyente

El reactivo original (Drabkin) tenía un pH de 8,6. La solución modificada posterior, el reactivo tipo Drabkin, siguiendo recomendaciones del International Committee for Standardization in Haematology[2], tiene un pH de 7,0-7,4. Tiene menos tendencia a causar turbidez por precipitación de las proteínas del plasma y necesita un tiempo de conversión más corto (3-5 min) que la solución de Drabkin original, pero tiene la desventaja de que el detergente produce algo de espuma:

Ferrocianuro de potasio (0,607 mmol/l)	200 mg
Cianuro de potasio (0,768 mmol/l)	50 mg
Potasio dihidrógeno fosfato (1,029 mmol/l)	140 mg
Detergente no iónico	1 ml
Agua destilada o desionizada	Hasta 1 l

Los detergentes no iónicos adecuados son Nonidet P40 (VWR International, Merck, Eurolab) y Triton X-100 (Aldrich).

El pH debe ser de 7,0-7,4 y hay que verificarlo con un pHmetro al menos una vez al mes. El diluyente debe ser claro y tener un color amarillo pálido. Al medirlo utilizando el agua como blanco en un espectrómetro a una longitud de onda de 540 nm, la absorbancia debe ser cero. Si se almacena a temperatura ambiente en una botella de vidrio marrón de borosilicato, la solución se mantiene durante varios meses. Si la temperatura ambiente es superior a los 30 °C, se debe conservar la solución en el refrigerador y llevarla a temperatura ambiente antes de utilizarla. No hay que dejar que se congele. Se debe desechar el reactivo si se vuelve turbio, si el pH está fuera del rango de 7,0-7,4 o si su absorbancia es distinta de cero a 540 nm contra el agua como blanco.

Patrón de referencia de la cianmetahemoglobina

La llegada de la solución de HiCN, que es estable durante muchos años, ha ocasionado que otros patrones queden desfasados[10]. El International Committee for Standardization in Haematology[2] ha definido las características, en base a la masa molecular relativa (peso molecular), de la hemoglobina humana de 64458 (es decir, 16114 como monómero) y un área de absorbancia milimolar (coeficiente de extinción) de 11,0[b].

Algunos patrones se preparan a partir de la sangre de buey, que tiene el mismo coeficiente de extinción pero un peso molecular de 64532 (16133 como monómero). Estas características han sido ampliamente adoptadas; la Organización Mundial de la Salud (OMS) las ha establecido en una norma internacional y disponemos también de un material de referencia comparable del European Community Bureau of Reference (BCR) (v. pág. 591). Hay preparaciones, realizadas en conformidad con estas características internacionales, disponibles comercialmente. Contienen entre 550 y 850 mg de hemoglobina por litro y la concentración exacta se indica en la etiqueta.

La solución de HiCN se dispensa en ampollas selladas de 10 ml y se considera una dilución de sangre completa. La Hb original que representa se obtiene multiplicando la cifra indicada en la etiqueta por la dilución que se aplicará a la muestra sanguínea. De esta forma, si la solución estándar contiene 800 mg (0,8 g) de hemoglobina por litro, tendrá la misma densidad óptica que una muestra de sangre que contenga 160 g/l de hemoglobina si está diluida al 1 por 200, o que una que contenga 200 g/l de hemoglobina diluida al 1 por 250[c].

La preparación de referencia de la HiCN está diseñada fundamentalmente para ser comparada directamente con la sangre transformada en HiCN. También puede utilizarse para la normalización de un patrón de sangre completa con el método de la HbO_2 (analizado más adelante).

Método

Preparar una dilución al 1 por 201 de sangre añadiendo 20 µl de sangre en 4 ml de diluyente. Tapar el tubo que contiene la solución e invertirlo varias veces. Colocar vertical la muestra de sangre y dejarla a temperatura ambiente durante al menos 5 min (para asegurar la transformación completa de hemoglobina en cianmetahemoglobina) y después verterla en un tubo y leer la absorbancia en un espectrómetro a 540 nm o en un colorímetro fotoeléctrico con un filtro adecuado (p. ej., Ilford 625, Wratten 74 o Chance 0 Gr1) contra un blanco de reactivo. La absorbancia de la muestra que se prueba debe medirse dentro de las 6 h siguientes a su dilución inicial. También hay que comparar la absorbancia de un patrón de HiCN comercialmente disponible (expuesto a temperatura ambiente en caso de estar almacenado anteriormente en un refrigerador) con un blanco de reactivo en el mismo espectrómetro o colorímetro fotoeléctrico que la muestra del paciente. El patrón debe conservarse en la oscuridad, y para garantizar que no está contaminado, hay que desechar cualquier solución no utilizada al finalizar el día en que se abrió la ampolla.

[b] Es decir, la absorbancia de una solución que contenga 55,8 mg de hierro de hemoglobina por litro a 540 nm.

[c] En el Sistema Internacional (SI), la hemoglobina se puede expresar en términos de concentración de sustancia como µmol/l o de concentración de masa como g/l (o g/dl) o µmol/l = g/l × 0,062. Con fines clínicos, hay más ventajas prácticas cuando se expresa la hemoglobina en concentración de masa por litro o por decilitro (dl).

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Cálculo de la concentración de hemoglobina

$$\text{Hb (g/l)} = \frac{A^{540} \text{ de la prueba de la muestra}}{A^{540} \text{ del patrón}} \times \text{Concentración del patrón} \times \frac{\text{Factor de dilución } (201)^{d}}{1.000}$$

Preparación del gráfico estándar y de la tabla estándar

Cuando hay que analizar varias muestras sanguíneas, es conveniente leer los resultados en un gráfico estándar o en una tabla relacionada con las lecturas de la absorbancia de la hemoglobina en g/l para cada instrumento individual. Este gráfico debe prepararse cada vez que se utilice un nuevo fotómetro o cuando se sustituya una bombilla o cualquier otro componente. Puede prepararse de la siguiente forma.

Preparar cinco diluciones del patrón de referencia de HiCN (o de una preparación equivalente) (llevado a temperatura ambiente) con el reactivo cianuro-ferrocianuro según la tabla 3.1. Dado que el gráfico se utilizará para determinar las concentraciones de hemoglobina, es esencial que las diluciones se realicen de forma precisa.

La concentración de hemoglobina de la preparación de referencia en cada tubo se representará gráficamente contra la medición de la absorbancia. Por ejemplo, si la etiqueta de la preparación de referencia indica que contiene 800 mg/l (es decir, 0,8 g/l) y el método para medir la hemoglobina utiliza una dilución de 1:201, las respectivas concentraciones de hemoglobina de los tubos 1-5 serían 160 g/l, 120 g/l, 80 g/l, 40 g/l y cero.

Utilizando un papel de gráfico lineal, representar los valores de la absorbancia en el eje vertical y los valores[e] de la hemoglobina en el eje horizontal. (Si las lecturas se dan según el porcentaje de transmitancia, utilizar un papel semilogarítmico con la transmitancia registrada en la vertical correspondiente a la escala logarítmica.) Los puntos deben ajustarse a una línea recta que pase por el origen. Siempre que el patrón se haya diluido correctamente, esto nos servirá para comprobar que la calibración del fotómetro sea lineal. A partir del gráfico se puede construir una tabla con las lecturas y los valores de la hemoglobina correspondientes. La tabla resulta más práctica que leer los valores en un gráfico cuando se analizan muchas muestras. Es importante que las prestaciones del instrumento no varíen y que su calibración permanezca constante en relación con las determinaciones de hemoglobina. Para garantizarlo, se debe valorar la preparación de referencia a intervalos frecuentes, preferiblemente con cada lote de muestras sanguíneas.

[d] El factor de dilución será 251 en lugar de 201 si la dilución inicial es 1 por 250 (es decir, 20 µl de sangre en 5 ml de reactivo).

[e] Absorbancia; anteriormente denominada densidad óptica. En algunos instrumentos, las mediciones se leen como porcentaje de la transmitancia.

Tabla 3.1. Diluciones de la solución de referencia de la cianmetahemoglobina (HiCN) para la preparación de un gráfico estándar

Tubo	Hemoglobina[a] (%)	HiCN volumen (ml)	Reactivo volumen (ml)
1	100 (potencia total)	4,0 (nítido)	Ninguno
2	75	3,0	1,0
3	50	2,0	2,0
4	25	1,0	3,0
5	0	Ninguno	4,0 (nítido)

[a] Como porcentaje de la hemoglobina en la solución de referencia.

Las principales ventajas del método de la HiCN para la determinación de la hemoglobina son que permite una comparación directa con el patrón de referencia y que no hay que hacer las lecturas inmediatamente después de la dilución, por lo que se pueden agrupar las muestras en lotes. Tiene también la ventaja de que, a excepción de la SHb, todas las formas de hemoglobina se convierten rápidamente en HiCN.

La velocidad de transformación de la sangre que contiene HbCO es notablemente lenta. Esta dificultad puede soslayarse prolongando el tiempo de reacción hasta los 30 min antes de la lectura[1]. La diferencia entre las lecturas a los 5 y los 30 min se puede utilizar como un método semicuantitativo para calcular el porcentaje de HbCO en la sangre.

Como hemos mencionado antes, se puede emplear el lauril sulfato[5] o la azida sódica[3] como sustitutos no peligrosos del cianuro potásico. Sin embargo, no disponemos de patrones estables para estos métodos, por lo que necesitamos tener una muestra de sangre, con un valor de hemoglobina asignado inicialmente por el método de la HiCN, para utilizarla como un patrón secundario.

Las proteínas plasmáticas anómalas o el recuento leucocitario elevado pueden producir turbidez cuando la sangre se diluye con el reactivo tipo Drabkin. Esta turbidez puede evitarse centrifugando la muestra diluida o incrementando la concentración del potasio dihidrógeno fosfato hasta los 33 mmol/l (4,0 g/l)[12].

MÉTODO DE LA OXIHEMOGLOBINA

El método de la HbO_2 es el más simple y rápido para su uso generalizado con un fotómetro. Su desventaja radica en que no es posible preparar un patrón de HbO_2 estable, por lo que hay que verificar la calibración de estos instrumentos a intervalos regulares utilizando soluciones de referencia de HiCN o un patrón secundario de sangre conservada o de un hemolizado (v. pág. 25). La fiabilidad del método no se altera por un aumento moderado de la bilirrubina plasmática, pero no es satisfactoria en presencia de carboxihemoglobina, metahemoglobina o SHb.

Método

Lavar 20 ml de sangre en un tubo que contenga 4 ml de 0,4 ml/l de amoníaco (densidad 0,88) para obtener una dilución al 201. Utilizar un tapón que ajuste firmemente y realizar la mezcla invirtiendo el tubo varias veces. La solución de HbO_2 está ahora lista para compararla con un patrón en un espectrómetro a 540 nm o en un fotómetro con un filtro amarillo-verde (p. ej., Ilford 625) contra agua como blanco. Si la absorbancia de la solución de hemoglobina sobrepasa los 0,7, diluir aún más la sangre con un volumen igual de agua y realizar una nueva lectura. Cada semana se debe preparar una solución fresca de amoníaco. Una vez diluida, la muestra sanguínea es estable a 20 °C durante 2 días.

Patrón

El patrón debe prepararse a partir de una muestra de sangre total normal anticoagulada. En primer lugar, se determina su concentración de hemoglobina con el método de la HiCN (v. pág. 25). Después se diluye la sangre a 1:201, pipeteando 20 ml de sangre bien mezclada en 4 ml de amoníaco; se hacen diluciones secuenciales en amoníaco y se lee la absorbancia en un espectrómetro a 540 nm o en un fotómetro utilizando un filtro amarillo-verde (Ilford 625, Wratten 74 o Chance 0 Gr1). Las lecturas se representan en un papel gráfico aritmético. Se comprueba la linealidad de la respuesta y se relaciona la absorbancia con la hemoglobina a partir de las mediciones obtenidas en la muestra original con el método de la HiCN.

Desgraciadamente, los colorímetros y los filtros de luz difieren lo suficiente unos de otros para que sea fundamental comprobar el patrón elegido a intervalos frecuentes contra una preparación de referencia de HiCN en el fotómetro que vaya a utilizarse. Posiblemente sea preferible utilizar una nueva muestra fresca de sangre total cada día como patrón secundario tras medir su hemoglobina con el método de la HiCN. En su lugar se puede utilizar la sangre conservada o la lisada (v. pág. 564).

Cálculo directo a partir del patrón:

$$\text{Hb (g/l)} = \frac{A^{540}\text{ de la muestra problema}}{A^{540}\text{ del patrón}} \times \text{Concentración del patrón} \times \frac{\text{Factor de dilución}}{1.000}$$

Si no se dispone del método de la HiCN, se puede utilizar un filtro gris neutro de densidad 0,475 (Ilford o Chance) como patrón de calibración. Correspondería a una dilución al 1:201 de sangre con 146 g/l de hemoglobina en una cubeta de 1 cm a una longitud de onda de 540 nm.

ESPECTROMETRÍA DIRECTA

La hemoglobina de una muestra de sangre diluida puede determinarse por espectrometría sin necesidad de un patrón, siempre que el espectrómetro esté correctamente calibrado. La sangre se diluye al 1:201 (o 1:251) con el reactivo de cianuro-ferrocianuro (v. pág. 25) y se mide la absorbancia a 540 nm. La hemoglobina se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Hb (g/l)} = \frac{(A^{540}\text{ HiCN} \times 16114 \times \text{Factor de dilución})}{(11{,}0 \times d \times 1.000)}$$

$$\text{o Hb (µmol/l)} = \frac{(A^{540}\text{ HiCN} \times \text{Factor de dilución})}{(11{,}0 \times d \times 1.000)}$$

donde A^{540} = absorbancia de la solución a 540 nm; 16114 = peso molecular monomérico de la hemoglobina; dilución = 201 al diluir 20 ml de sangre en 4 ml de reactivo; 11,0 = coeficiente de extinción milimolar; d = grosor de la capa en cm, y 1.000 = conversión de mg a g.

Al asignar un valor a la solución de hemoglobina para utilizarla como preparación de referencia, es necesario calibrar en primer lugar el espectrómetro. Para ello necesitamos comprobar la longitud de onda con un filtro de óxido de holmio, la absorbancia con un juego de filtros calibrados de densidad neutra y la luz difusa con un filtro de densidad neutra a 220 nm[f]. Hay que utilizar tubos de cristal de cuarzo o vidrios ópticos equivalentes que tengan una diferencia en la transmisión <1% a 200 nm. Posteriormente, se verificará la calibración del espectrofotómetro comprobando que da una lectura adecuada del patrón de la HiCN. Las desviaciones ligeras en el valor esperado de la A^{540} de la HiCN para el patrón pueden utilizarse para corregir los resultados de las muestras cuando haya un sesgo en la medición[2].

HEMOGLOBINÓMETROS PORTÁTILES DE LECTURA DIRECTA

Comparadores de color

Son dispositivos clínicos sencillos que comparan el color de la sangre contra un rango de colores que representan las concentraciones de la hemoglobina. Están diseñados para detectar las anemias cuando no se dispone de instalaciones de laboratorio y se describen en el capítulo 27.

Hemoglobinómetros portátiles

Los hemoglobinómetros portátiles tienen un filtro incorporado y una escala calibrada para realizar lecturas directas de la hemoglobina en g/dl o g/l. Se basan, por lo general, en el método de la HbO_2. Actualmente, disponemos de diversos instrumentos que utilizan un diodo emisor de luz con una longitud de onda apropiada y que están normalizados para dar los mismos resultados que con el método de la HiCN.

[f] Por ejemplo, del National Physical Laboratory, Teddington, TW11 0LW, Reino Unido.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

El sistema HemoCue (HemoCue AB, Ängelsholm, SE-262 23, Suecia) es un método bien establecido para la práctica de la hemoglobinometría. Consiste en un espectrómetro precalibrado, portátil, que funciona con pilas; no se necesita ninguna dilución porque la sangre se desliza directamente por capilaridad en un tubo que contiene nitrito de sodio y azida sódica, convirtiendo la hemoglobina en azida-metahemoglobina. La absorbancia se mide a longitudes de onda de 565 y 880 nm. Las mediciones no se alteran cuando existen niveles elevados de bilirrubina, lípidos o leucocitos, y el método es lo suficientemente fiable para su utilización como instrumento de laboratorio; es sencillo de utilizar por el personal no técnico y, por tanto, adecuado para su utilización a la cabecera del paciente. Hay que conservar los tubos en un contenedor con un agente secante y mantenerlos en un rango de temperaturas de 15-30 °C.

El hemoglobinómetro DHT (Gordon-Keeble, Barton Mills, IP28 7DX, Reino Unido) es un espectrómetro precalibrado de lectura directa que mide la hemoglobina en sangre diluida al 1:100 en 0,4 g/l de agua amoniacada. Funciona a una longitud de onda establecida de 523 nm, elegida en el punto en que se cruzan las curvas de absorción de las formas habituales de hemoglobina, todas las cuales están incluidas en la medición. Un estudio de validación sobre un lote de muestras sanguíneas mostró resultados con una diferencia de 2-3% sobre el método de referencia; sin embargo, las diferencias son, por lo general, del 8-10% con el instrumento DHT, que tiende a dar lecturas superiores al método de referencia (se pueden ver los datos en www.gordon-keeble.co.uk/haemoglobin).

Pruebas de detección no invasivas

Se están desarrollando métodos para utilizar la espectroscopia cercana al infrarrojo en zonas corporales, principalmente en un dedo, para identificar el patrón espectral de la hemoglobina en un vaso sanguíneo subyacente y obtener una medición de la concentración de hemoglobina. Los estudios iniciales han mostrado una correlación aproximada con la hemoglobinometría sanguínea[13,14].

Intervalo normal de la hemoglobina

Véanse las tablas 2.2, 2.3 y 2.4 del capítulo 2. Debe observarse la existencia de diferencias de género, variaciones diurnas y factores ambientales y fisiológicos, que también deben considerarse.

VOLUMEN DEL PAQUETE DE HEMATÍES O HEMATOCRITO

El hematocrito (Hto) puede utilizarse como una prueba simple de detección de las anemias, como un método de referencia para calibrar los sistemas de recuento sanguíneo automatizados y como una indicación a grandes rasgos de la exactitud de las mediciones de la hemoglobina. El hematocrito × 1.000 es aproximadamente tres veces el valor de la hemoglobina expresado en g/l. Junto con los cálculos de la hemoglobina y del recuento eritrocitario (RE), puede utilizarse para el cálculo de los índices eritrocitarios. Sin embargo, su utilización en laboratorios con pocos recursos puede estar limitada por la necesidad de una centrífuga especializada y de un suministro fiable de tubos capilares.

MÉTODO DEL MICROHEMATOCRITO[15]

El método del microhematocrito[15] se realiza con la sangre contenida en tubos capilares de 75 mm de longitud y con un diámetro interno de aproximadamente 1 mm. Pueden ser tubos simples para su uso con muestras sanguíneas anticoaguladas, o revestidos internamente con 1 UI de heparina para la recogida directa de la sangre capilar. La centrífuga utilizada para los tubos capilares proporciona una fuerza centrífuga de 12.000 g y una centrifugación de 5 min permite obtener un Hto constante. Cuando el Hto es mayor de 0,5 puede ser necesario centrifugar durante otros 5 min.

Hay que dejar que la sangre, procedente de una muestra bien mezclada o fluyendo libremente de una punción cutánea, penetre en el tubo por capilaridad, dejando al menos 15 mm vacíos. Después, se sella el tubo con un sello plástico (p. ej., Cristaseal, Hawksley, Lancing, Sussex). No se recomienda el sellado del tubo por medio de calor pues el sello tiende a estrecharse progresivamente y existe la probabilidad de que se produzca lisis. Después de la centrifugación de 5 min, se mide la proporción de células con respecto a la columna total (es decir, el Hto) utilizando un dispositivo de lectura.

Precisión del microhematocrito

El método del microhematocrito tiene un nivel adecuado de exactitud y precisión para resultar de utilidad clínica[16]. Sin embargo, hay que prestar atención a diversos factores que pueden producir un resultado inexacto.

Anticoagulantes

Se recomienda el uso del K_2-EDTA, porque el K_3-EDTA produce la contracción de los eritrocitos, reduciendo el Hto en cerca de un 2%. Una concentración de anticoagulante por encima de los 2,2 mg/ml puede producir también un Hto falsamente bajo como resultado de la contracción celular.

Muestra sanguínea

Como el Hto aumenta gradualmente con el almacenamiento, la prueba debe realizarse antes de las 6 h de recoger la muestra sanguínea, aunque se acepta un retraso de hasta 24 h si se conserva la sangre a 4 °C.

Si no se mezcla la muestra sanguínea adecuadamente, obtendremos un resultado inexacto. El grado de oxigenación de la sangre afecta también al resultado porque el Hto de la sangre venosa es ~2% más alto que el de la sangre

totalmente oxigenada (que ha perdido el CO_2 y captado O_2)[17]. Para asegurar la oxigenación y la adecuada mezcla de la sangre, el espacio con aire libre sobre la muestra debe ser >20% del volumen del contenedor.

Tubos capilares

La variación del calibre de los tubos puede originar errores graves si no se encuentra dentro de los límites estrechos definidos por las características que deben cumplir los fabricantes: longitud 75 ± 0,5 mm; diámetro interno 1,07-1,25 mm; grosor de la pared 0,18-0,23 mm y estrechamiento del calibre que no exceda el 2% del diámetro interno en toda la longitud del tubo[16].

Centrífuga

Las centrífugas deben revisarse a intervalos periódicos (al menos anualmente) con un tacómetro para la velocidad y con un cronómetro para la exactitud del temporizador. Hay que comprobar también la eficacia del apilamiento mediante el centrifugado de muestras de sangre normal y policitémica durante tiempos diferentes, de 5 a 10 min, para determinar el tiempo mínimo necesario para un apilamiento completo de los eritrocitos.

Lectura

La prueba debe leerse tan pronto como sea posible tras la centrifugación, porque los eritrocitos comienzan a hincharse y la interfaz se vuelve cada vez más indiferenciada. Para evitar los errores de la lectura con el dispositivo de lectura especial, se debe utilizar una lente de aumento. Hay que excluir tanto como sea posible los leucocitos y las plaquetas (la capa de leucocitos) de la lectura de los eritrocitos apilados. Si no se dispone de un dispositivo de lectura especial, la proporción de la columna eritrocitaria con respecto a la columna total puede calcularse mediante la medición obtenida colocando el tubo contra un papel gráfico aritmético o contra una regla.

Plasma atrapado

La cantidad de plasma atrapado entre los eritrocitos, sobre todo en el extremo inferior de la columna eritrocitaria, se contrarresta, por lo general, con la deshidratación de los eritrocitos durante la centrifugación y, habitualmente, el error producido por el plasma atrapado no es superior a las 0,01 unidades de Hto. Por lo tanto, en la práctica de rutina, no es necesario hacer correcciones para el plasma atrapado pero, si se necesita el Hto para calibrar un analizador de células sanguíneas o para calcular el volumen de sangre, el Hto observado debe reducirse con un factor de corrección del 2% después de la centrifugación durante 5 o 10 min con sangre policitémica[18]. No obstante, es preferible utilizar el método de referencia sustituto. El plasma atrapado aumenta en las anemias macrocíticas[19], las esferocitosis, la talasemia, las anemias hipocrómicas y la anemia de células falciformes[20]; pudiendo llegar hasta el 20% en la anemia de células falciformes si todas las células son deformes[19].

MÉTODO DE REFERENCIA DEL INTERNATIONAL COUNCIL FOR STANDARDIZATION IN HAEMATOLOGY[21]

La hemoglobina se mide por métodos rutinarios en las muestras de sangre comprendidas en un intervalo de concentraciones de hemoglobina. Después se toman muestras de los mismos especímenes en tubos capilares de vidrio de borosilicato especiales, que se centrifugan durante 5 min o más para conseguir el apilamiento completo de los eritrocitos. Posteriormente, los tubos se rompen en el punto medio de los eritrocitos apilados, se extrae la sangre con una micropipeta y se mide la hemoglobina. El Hto se calcula como la razón entre la Hb de la sangre completa y la de las células apiladas. Este método es aceptable para los fabricantes de instrumentos y de reactivos, pero requiere mucho tiempo y mucha pericia, por lo que es poco práctico para su uso ocasional en los laboratorios de rutina. Por consiguiente, el International Council for Standardization in Haematology (ICSH) ha desarrollado un «método de referencia alternativo»[22].

Método de referencia alternativo

Equipo

Centrífuga de microhematocrito estándar.

Tubos capilares de vidrio borosilicato con las siguientes características: longitud 75 ± 0,5 mm; diámetro interno 1,55 ± 0,085 mm; diámetro externo 1,9 ± 0,085 mm[g].

Receptáculo de tubos capilares consistente en un portaobjetos de vidrio de 75 × 25 mm montado sobre otro portaobjetos de 75 × 50 mm.

Microscopio binocular con una escala de nonio adaptada.

Método

1. Tomar muestras dobles de sangre bien mezclada con los tubos capilares especificados y centrifugarlas como se describe en la página 28.
2. A continuación, quitar los tubos de la centrífuga, alinearlos uno por uno contra el borde del portaobjetos de 25 mm y colocarlo sobre la platina del microscopio.
3. Verificar que el tubo capilar está alineado en posición horizontal real con respecto al campo de visión y, utilizando un poder de resolución bajo, registrar en la escala de nonio las longitudes del tubo en las interfases de: *a)* eritrocitos y sello; *b)* eritrocitos y leucocitos, y *c)* plasma y aire.
4. Calcular el Hto centrifugado = (B-A)/(C-A). Determinar la aceptabilidad de las mediciones emparejadas; la muestra duplicada no debe diferir en más de 0,007 unidades; de lo contrario, hay que repetir las pruebas por parejas.
5. Calcular el Hto de referencia alternativo a partir de la fórmula:

[g] Por ejemplo, Drummond Scientific, Broomall, PA 19008: Catalogue # 1-000-7510.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

$$\frac{(\text{Hto centrifugado} - 0{,}0119)}{0{,}9736}$$ [h]

Si los métodos de referencia alternativos van a utilizarse para validar equipos o métodos, se necesita un mínimo de seis muestras de sangre diferentes, al menos dos en cada uno de los rangos del Hto de 0,20-0,25, 0,40-0,45 y 0,60-0,65. Si es necesario, el Hto de las muestras normales puede ajustarse con la adecuada adición o eliminación de plasma autólogo.

Intervalo normal del hematocrito

Véase el capítulo 2.

RECUENTOS MANUALES DE CÉLULAS E ÍNDICES ERITROCITARIOS

Los principios de los recuentos manuales de células, el uso de la cámara de recuento del hemocitómetro para el recuento manual de los leucocitos y de las plaquetas y las limitaciones de estas mediciones se describen en el capítulo 27.

Un RE preciso permite el cálculo del volumen corpuscular medio (VCM) y de la hemoglobina corpuscular media (HCM). En los laboratorios bien equipados, en los que estos índices son proporcionados por un sistema automatizado (v. pág. 40), la importancia clínica que se les da es considerable y se utilizan de forma habitual para la clasificación de las anemias. Cuando no se utilizan analizadores automatizados, los RE manuales (y, consecuentemente, los cálculos de estos índices eritrocitarios) son tan imprecisos y consumen tanto tiempo que se han vuelto obsoletos.

La única medición que puede obtenerse con una precisión razonable por métodos manuales es la concentración de la hemoglobina corpuscular media (CHCM) porque se obtiene a partir de la Hb y del Hto por medio de la siguiente fórmula:

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

Intervalo normal de la CHCM

Véase el capítulo 2.

RECUENTOS DE BASÓFILOS Y DE EOSINÓFILOS

Se cuenta el porcentaje de eosinófilos o de basófilos en un recuento diferencial de todos los leucocitos presentes en una extensión sanguínea teñida. Si se observan menos de 500 células, se continúa el recuento en una segunda extensión sanguínea. A continuación se calcula el recuento de eosinófilos o de basófilos por litro a partir del recuento leucocitario total. Es fundamental disponer de extensiones sanguíneas finas y preferentemente cortas, con leucocitos fácilmente identificables y distribuidos de manera uniforme por toda la extensión (v. pág. 31).

Intervalo normal del recuento de eosinófilos

Véase el capítulo 2.

Normalmente, hay una considerable variación diurna en el recuento de eosinófilos y se han registrado diferencias de hasta el 100%. Los recuentos más bajos se observan por la mañana (desde las 10:00 hasta el mediodía) y los mayores por la noche (desde medianoche hasta las 16:00)[23,24]. Para revisar las causas de eosinofilia, véase la referencia bibliográfica 25.

Intervalo normal del recuento de basófilos

Véase el capítulo 2.

Gilbert y Ornstein[26] notificaron una distribución del 95% en sujetos normales de 0,01-0,08 × 10^9/l. No hay diferencias relacionadas con la edad ni con el género, aunque los recuentos seriados han mostrado valores inferiores durante la ovulación[27].

RECUENTO MANUAL DEL DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS

Los recuentos diferenciales de leucocitos se realizan habitualmente mediante el examen visual de las extensiones sanguíneas preparadas en un portaobjetos con la técnica del frotis o de la «cuña». Desgraciadamente, incluso en las preparaciones bien extendidas, la distribución de los diversos tipos celulares no es totalmente aleatoria (v. más adelante).

Para que el recuento diferencial en las preparaciones extendidas sobre los portaobjetos sea fiable, la extensión no debe ser demasiado delgada y la cola debe acabar de forma suave. Para conseguirlo, hay que hacer la extensión con un movimiento rápido utilizando un portaobjetos de vidrio fino para extender. Así obtendremos una extensión en la que habrá algún solapamiento de los eritrocitos, que irá disminuyendo hasta la separación en las proximidades de la zona final y en la que los leucocitos en el centro de la extensión no estén demasiado contraídos. Si la extensión es demasiado delgada o si se utiliza un portaobjetos con un borde áspero para extender, muchos de los leucocitos, quizás hasta el 50%, se acumularán en los bordes y en el extremo final (fig. 3.1). Además, la irregularidad cualitativa macroscópica en la distribución es la regla: los neutrófilos polimorfonucleares y los monocitos predominan en los márgenes y en la cola; mientras que los linfocitos abundan en el centro de la extensión (fig. 3.2). Es probable que la causa de esta separación sean las diferencias en la adhesividad, el tamaño y la densidad de los distintos tipos de células.

[h] Esta fórmula es aplicable únicamente a los tubos capilares especificados; para otros tubos es necesaria una validación específica por el método de referencia del ICSH[21] de forma que se pueda obtener una fórmula apropiada.

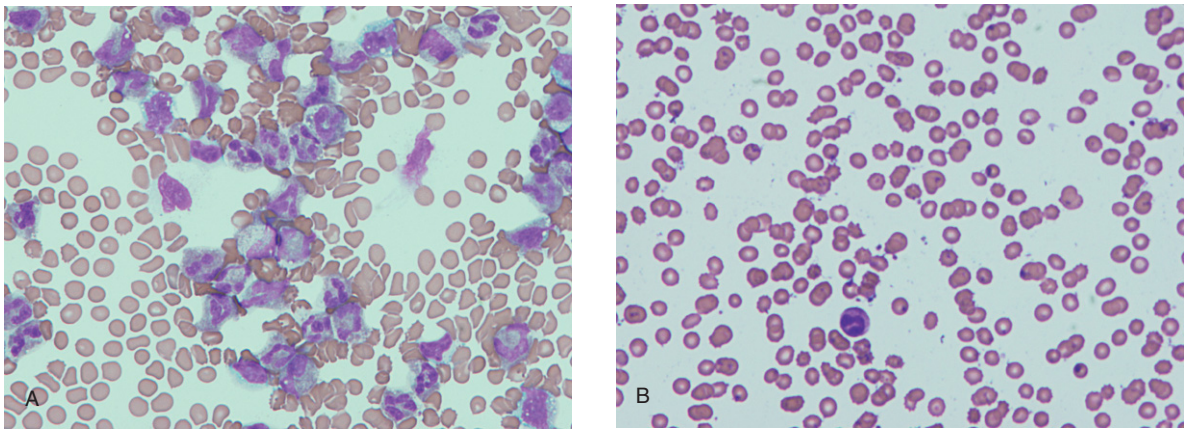


Figura 3.1. Extensión mal realizada. Dos áreas de una extensión mal realizada en un paciente con un recuento leucocitario de 20 × 10^9/l mostrando (A) muchos leucocitos en la cola y (B) muy pocos leucocitos en el cuerpo de la extensión.

También es probable que estas diferencias en la distribución de los diversos tipos de células se encuentren siempre presentes en cierto grado incluso en las extensiones bien hechas. Se han propuesto diversos sistemas para realizar el recuento diferencial, pero ninguno puede compensar las irregularidades macroscópicas de la distribución en una extensión mal hecha. En las extensiones bien hechas, se recomienda la siguiente técnica de recuento.

Método

Contar las células utilizando un objetivo ×40 en una franja que recorra la longitud completa de la extensión. Evitar los bordes laterales de la extensión. Inspeccionar la extensión desde la cabeza hasta la cola y, si se encuentran menos de 100 células en una sola franja estrecha, examinar una o más franjas adicionales hasta que se cuenten al menos 100 células. Cada franja longitudinal representa la sangre extraída de una pequeña parte de la gota original de sangre al extenderla con el portaobjetos (fig. 3.3). Si se cuentan todas las células en una de esas franjas, los diferenciales totales se aproximarán mucho al recuento diferencial real. Esta técnica puede resultar errónea si no se pueden identificar las células en la parte gruesa de la extensión; además, no permite que haya un exceso de neutrófilos y de monocitos en los bordes de la extensión, pero esta preponderancia es ligera en una extensión bien realizada y en la práctica hay poca diferencia en el resultado.

La técnica es fácil de realizar; en los recuentos elevados (10-30 × 10^9 células por litro) es de desear una extensión corta, de unos 2-3 cm. En pacientes con recuentos muy altos (como en la leucemia), no se puede utilizar este método y hay que contar las células en un área bien extendida donde los tipos celulares sean fácilmente identificables. Otros sistemas de recuento, como el método «en almenas», son más elaborados pero pueden minimizar el error debido a la variación en la distribución de las células entre el centro y el borde de la extensión. Los resultados del recuento diferencial pueden registrarse utilizando un registro manual múltiple o pueden introducirse directamente en el ordenador.

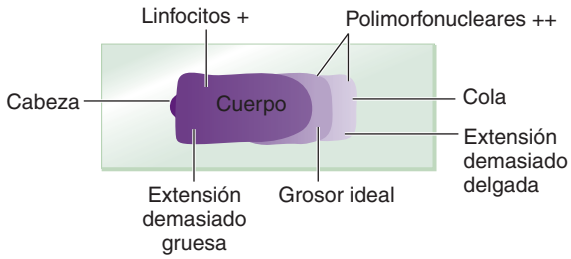


Figura 3.2. Dibujo esquemático de una extensión sanguínea realizada en un portaobjetos. La extensión se ha realizado de izquierda a derecha. Se da una indicación de la forma en que los leucocitos se distribuyen (v. texto).

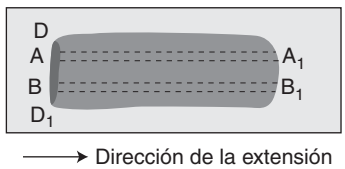


Figura 3.3. Dibujo esquemático que ilustra el método longitudinal de realizar los recuentos diferenciales de leucocitos. La gota original de sangre se extiende entre el portaobjetos con el que se hace la extensión y el portaobjetos en que se hace el frotis (D-D_1). La extensión se hace de forma que las bandas representativas de la extensión, tales como la A-A_1 y la B-B_1, se formen de la sangre originalmente dispuesta en A y en B, respectivamente. Para realizar un recuento diferencial exacto, hay que inspeccionar y clasificar todos los leucocitos en una o más bandas, tales como A-A_1 y B-B_1.

Las variaciones en el recuento diferencial dependen no solamente de los artefactos en la distribución originados por la maniobra de extensión, sino también de la distribución «aleatoria»; ambas son, sin duda, las causas más importantes de los recuentos diferenciales no fiables. La distribución aleatoria significa que si se cuentan un total de 100 células con una proporción real de neutrófilos del 50%, el intervalo (±2DE) en el que caerá el 95% del recuento será del orden de ±14% (es decir, 36-64%) de neutrófilos. Un recuento de 200 células puede proporcionar un cál-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

culo más preciso; en el ejemplo anterior, el intervalo ±2DE será del 40-60%. En un recuento de 500 células, el intervalo se reducirá a 44-56% de neutrófilos. En la práctica, se recomienda un recuento de 100 o 200 células como procedimiento de rutina. Sin embargo, si existen células anómalas en cantidades pequeñas, hay más probabilidad de detectarlas con los recuentos de 200-500 células que con los de 100 células.

Informe del recuento diferencial de leucocitos

El recuento diferencial, expresado como el porcentaje de cada tipo de células, debe relacionarse con el recuento de leucocitos totales e indicar los resultados en números absolutos ($\times 10^9$/l). Si existen mielocitos y metamielocitos se registran aparte de los neutrófilos. Las células en banda se cuentan generalmente como neutrófilos, pero puede ser útil registrarlas de forma separada. Normalmente constituyen menos del 6% de los neutrófilos; su aumento puede indicar un proceso inflamatorio incluso en ausencia de una leucocitosis absoluta[28]. Sin embargo, el recuento de células en banda es impreciso y, aunque a veces se recomienda en los lactantes, no se ha demostrado su utilidad para predecir las bacteriemias ocultas en este grupo[29].

Corrección del recuento con los eritrocitos nucleados

Cuando existan eritrocitos nucleados (EN) se incluirán en el recuento leucocitario (RL) total, que es en realidad un «recuento total de células nucleadas» (RTCN). Deben incluirse también en el recuento diferencial, como porcentaje del RTCN y expresarse en números absolutos ($\times 10^9$/l) de la misma forma que los diferentes tipos de leucocitos. Si existen en números significativos, el RTCN debe corregirse para obtener el RL total verdadero. Así, por ejemplo, si el RL total es 8,0 × 10^9/l y el porcentaje de EN en el recuento diferencial es del 25%, entonces:

$$\text{RL corregido} = 8 - (8 \times 25/100) = 6 \times 10^9/\text{l}$$

Hay que prestar atención para diferenciar los linfocitos pequeños de los eritrocitos nucleados (p. ej., cap. 5, fig. 5.64).

Recuento diferencial de referencia de leucocitos

Se necesita un método de referencia para validar la exactitud de los sistemas automatizados (se describirá más adelante). El método que se ha utilizado ampliamente para este fin es, en esencia, similar al procedimiento manual de rutina de las extensiones sanguíneas teñidas pero, para asegurar una precisión aceptable, dos observadores independientes realizan un recuento de 200 células, cada uno en dos extensiones preparadas de la misma muestra[30]. Sin embargo, este método es aún demasiado impreciso para las células con baja frecuencia de aparición y se han hecho intentos para establecer un método de referencia utilizando una citometría de flujo con marcado específico por anticuerpos monoclonales de los distintos tipos celulares, incluyendo los leucocitos inmaduros[31,32].

Intervalo normal del recuento diferencial de leucocitos

Véase el capítulo 2.

RECUENTO PLAQUETARIO

El método para contar manualmente las plaquetas utilizando una cámara de recuento se describe en la página 677. Si disponemos de un RE realizado por un contador semiautomatizado, podemos obtener una aproximación del recuento plaquetario contando la proporción de plaquetas con respecto a los eritrocitos en una parte delgada de la extensión hecha a partir de una muestra sanguínea con EDTA, utilizando el objetivo de inmersión en aceite ×100 y, si es posible, oculares provistos con un diafragma ajustable, como el que se utiliza para el recuento de reticulocitos.

RECUENTO DE RETICULOCITOS

Los reticulocitos son eritrocitos jóvenes; contienen remanentes del ácido ribonucleico ribosómico (ARN) que estuvo presente en grandes cantidades en el citoplasma de los precursores nucleados de los cuales provienen. Los ribosomas tienen la propiedad de reaccionar con ciertos colorantes básicos como el azur B, el azul de cresil brillante o el nuevo azul de metileno (v. más adelante) para formar un precipitado azul o púrpura de los gránulos o de los filamentos.

Esta reacción se produce únicamente en las preparaciones teñidas vitalmente, sin fijar. Los estadios de la maduración pueden identificarse por sus características morfológicas. Los reticulocitos más inmaduros son los que presentan una cantidad mayor de material precipitable; en los menos inmaduros, sólo se observan unos cuantos puntos o algunas hebras cortas. Los reticulocitos pueden clasificarse en cuatro grupos que van desde los más inmaduros, con una gran acumulación de reticulina (grupo I), hasta los más maduros, con unos cuantos gránulos de reticulina (grupo IV) (fig. 3.4).

Si se deja secar una extensión sanguínea y posteriormente se la fija con metanol, los reticulocitos aparecen como eritrocitos policromáticos con una tinción basófila difusa si la extensión se tiñe con uno de los colorantes básicos.

Probablemente, la pérdida completa del material basófilo se produzca en la corriente sanguínea; sobre todo en el bazo después de que las células hayan abandonado la médula ósea[33]. Se cree que este proceso de maduración se realiza en 2-3 días, de los cuales cerca de 24 h se pasan en la circulación.

El número de reticulocitos en sangre periférica es un reflejo bastante preciso de la actividad eritropoyética, asumiendo que los reticulocitos se liberan normalmente por la médula ósea y que permanecen en la circulación por un

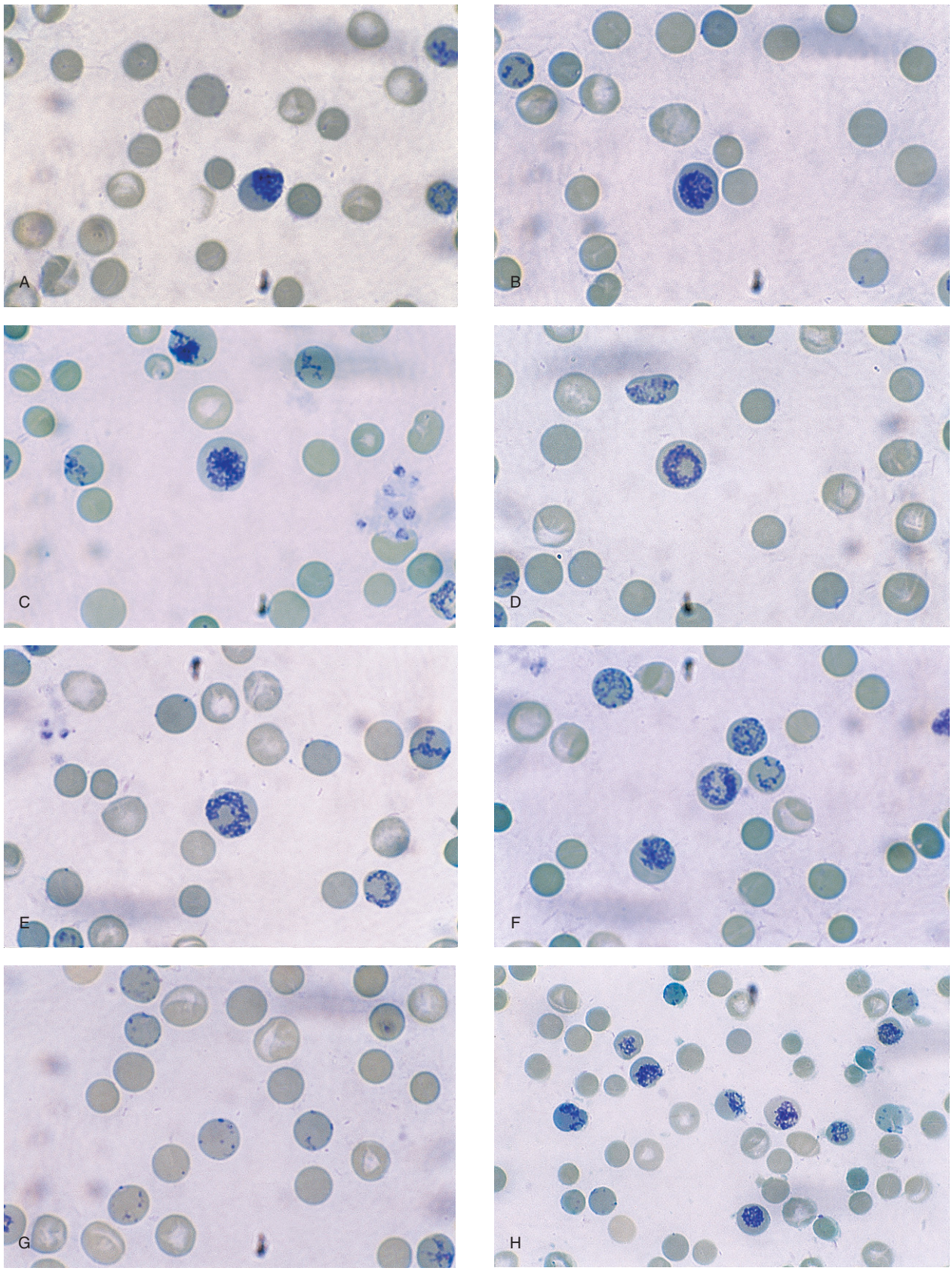


Figura 3.4. Microfotografías de reticulocitos en la que se muestran distintos estadios de maduración. A y B: La mayoría inmaduros (grupo I); C y D: Intermedios (grupo II); E y F: Estadio intermedio posterior (grupo III). G: La mayoría maduros (grupo IV), y H: Anemia hemolítica, tinción supravital con el nuevo azul de metileno.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

período de tiempo normal. Estas premisas no son siempre válidas, porque un aumento del estímulo eritropoyético produce una liberación prematura a la circulación. El tiempo medio de maduración de los denominados reticulocitos estimulados o de «estrés» puede durar hasta 3 días. En tales casos, se podrá encontrar en la circulación una proporción mayor de lo normal de reticulocitos inmaduros. Se puede realizar una evaluación más precisa de la maduración de los reticulocitos mediante una citometría de flujo cuantitativa de su contenido en ARN. Sin embargo, habitualmente se obtiene una información adecuada a partir de un recuento reticulocitario simple registrado ya sea como un porcentaje de los eritrocitos o, preferiblemente, cuando se conoce el RE, como el número en valor absoluto por litro. Cuando hay una anemia grave, hay que corregir el recuento reticulocitario por la anemia y expresarlo como un índice reticulocitario[34].

$$\text{Índice reticulocitario} = \text{reticulocitos observados en \%} \times \frac{\text{Hb o Hto medidos}}{\text{Hb o Hto normales adecuados}}$$

Tinción de reticulocitos

Se obtienen resultados mejores y más fiables con el nuevo azul de metileno[i] que con el azul de cresil brillante. El nuevo azul de metileno tiñe el material reticulofilamentoso de los reticulocitos más profunda y más uniformemente que el azul de cresil brillante, que varía de muestra a muestra en su capacidad de tinción. El azur B es un sustituto satisfactorio del nuevo azul de metileno; tiene la ventaja de que el colorante no precipita y se comercializa en forma pura[38]. Se utiliza en la misma concentración y el procedimiento de tinción es el mismo que con el nuevo azul de metileno.

Soluciones de tinción

Disolver 1,0 g de nuevo azul de metileno (CI 52030) o de azur B (CI 52010) en 100 ml de tampón fosfato isoosmótico a pH 6,5.

Método

Depositar 2 o 3 gotas de la solución de tinción en un tubo de plástico de 75 × 10 mm utilizando una pipeta Pasteur de plástico. Añadir 2-4 volúmenes de la sangre del paciente anticoagulada con EDTA a la solución de tinción y mezclarlas. Mantener la mezcla a 37 °C durante 15-20 min. Volver a poner en suspensión los eritrocitos agitando suavemente y hacer extensiones en los portaobjetos de la forma habitual. Cuando se sequen, examinar las extensiones sin fijarlas ni contrateñirlas.

El volumen exacto de sangre que se debe añadir a la solución colorante para su tinción óptima depende del RE. Se debe añadir una proporción mayor de sangre anémica y una proporción menor de sangre policitémica que de sangre normal. En una preparación correcta, el material reticulofilamentoso debe teñirse de azul intenso y las células no reticuladas con un degradado difuso de un azul verdoso pálido. No hay que contrateñir las extensiones. El material reticulofilamentoso no tiene mejor definición con la contratinción y el colorante precipitado por encima de las células puede causar confusión. Además, los cuerpos de Heinz no son visibles en las preparaciones fijadas y contrateñidas. Si la preparación teñida se examina bajo contraste de fase, hay una buena definición tanto de los eritrocitos maduros como de los reticulocitos. Con esta técnica, los reticulocitos tardíos, caracterizados por la presencia de remanentes de filamentos o de hebras, se distinguen fácilmente de las células que contienen los cuerpos de inclusión. Se pueden hacer recuentos satisfactorios en la sangre que se ha conservado (sin teñir) hasta las 24 h, aunque el recuento tenderá a reducirse después de 6-8 h, a menos que la sangre se mantenga a 4 °C.

Recuento de reticulocitos

El área de la extensión elegida para el recuento debe ser aquella que contenga células no distorsionadas y donde la tinción sea buena. Un fallo habitual es hacer la extensión demasiado delgada; no obstante, las células no deben solaparse. Para contar las células, se utiliza el objetivo de inmersión en aceite ×100 y, si es posible, los oculares provistos con un diafragma ajustable. Si no se dispone de oculares con un diafragma ajustable, se puede insertar en un ocular un diafragma de papel o de cartulina, en cuyo centro se haya recortado un pequeño cuadrado de 4 mm de longitud en sus lados; este dispositivo puede utilizarse como sustituto del diafragma ajustable, aunque no resulta tan apropiado.

El procedimiento de recuento debe adecuarse al número de reticulocitos presente cuando sólo existe una pequeña cantidad de reticulocitos; hay que examinar grandes cantidades de células si queremos obtener un recuento razonablemente preciso. Cuando el recuento es menor del 10%, un método apropiado es investigar campos sucesivos hasta que se hayan contado al menos 100 reticulocitos y contar el total de eritrocitos en al menos 10 campos para establecer el número medio de eritrocitos por campo.

Cálculo

Número de reticulocitos en n campos = x.
Número medio de eritrocitos por campo = y.
Número total de eritrocitos en n campos = n × y.
Porcentaje de reticulocitos = [x ÷ (n × y)] × 100%.
Recuento absoluto de reticulocitos = % × RE.

Así, cuando el porcentaje de reticulocitos es 3,3 y el RE es 5×10^{12}/l, el recuento absoluto de reticulocitos por litro es el siguiente: $[3{,}3/100] \times 5 \times 10^{12} = 165 \times 10^{9}$.

Es esencial que la preparación con reticulocitos se extienda de forma correcta para asegurar una distribución uniforme de las células en los campos consecutivos.

[i] El nuevo azul de metileno es químicamente diferente del azul de metileno, que es un mal colorante de reticulocitos.

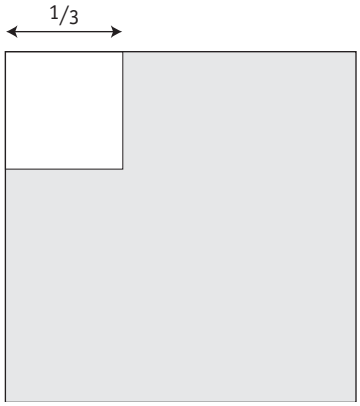


Figura 3.5. Ocular de Miller.

Cuando el recuento reticulocitario sobrepasa el 10%, sólo se tendrá que examinar un número relativamente pequeño de células para obtener un error estándar del 10%.

Un método alternativo se basa en el principio del muestreo equilibrado, utilizando un ocular de Miller[j]. Este ocular tiene un campo cuadrado y en una de sus esquinas hay trazada una pequeña cuadrícula, que ocupa la novena parte del área total del cuadrado (fig. 3.5). Los reticulocitos se cuentan en el cuadrado grande y el número total de eritrocitos se cuenta en la cuadrícula pequeña.

El número de campos que debe examinarse para obtener un grado determinado de precisión depende de la proporción de reticulocitos (tabla 3.2).

Es esencial que la preparación con reticulocitos se extienda de forma correcta y esté bien teñida. Otros factores importantes que afectan a la precisión del recuento son la agudeza visual y la paciencia del observador, así como la calidad y el poder de resolución del microscopio. Los recuentos más precisos los realizan observadores concienzudos que desconocen el nivel supuesto de reticulocitos, eliminando de esta forma el efecto del sesgo consciente o inconsciente.

Diferencias entre reticulocitos y otras inclusiones eritrocíticas

La decisión sobre lo que es o no es un reticulocito puede ser difícil porque los reticulocitos más maduros sólo contienen unos cuantos puntos o hebras de material reticulofilamentoso. Afortunadamente, en las preparaciones bien teñidas observadas con el microscopio óptico, el material granular de tipo Pappenheimer (que contiene hierro), presente por lo general como un pequeño punto único y menos habitualmente como puntos múltiples, se tiñe con un tono azul más oscuro que el material reticulofilamentoso del reticulocito. Como se ha descrito anteriormente, el contraste de fase ayudará a distinguirlos. Si hay alguna duda, los cuerpos de Pappenheimer pueden identificarse sobreteñendo la extensión con la tinción de Perls para el hierro.

La HbH se desnaturaliza en presencia del azul de cresil brillante o del nuevo azul de metileno, lo que produce unos cuerpos de inclusión redondos que se tiñen de azul verdoso (v. cap. 13, figs. 13.6 y 13.7). Estos cuerpos pueden diferenciarse fácilmente del material reticulofilamentoso (fig. 13.8).

Los cuerpos de Heinz se tiñen también con el nuevo azul de metileno, pero la tonalidad del azul es ligeramente más clara que la del material reticulofilamentoso de los reticulocitos y se tiñe bien con el violeta de metilo (figs. 13.5 y 13.6).

Tabla 3.2. Exactitud de los recuentos de reticulocitos con el ocular de Miller

	Reticulocitos	Error estándar (σ)		
Porcentaje	Proporción (p)	2%	5%	10%
1	0,01	27.500	4.400	1.100
2	0,02	13.600	2.180	550
5	0,05	5.280	845	210
10	0,10	2.500	400	100
25	0,25	835	135	35

Las columnas 3-5 indican el número total de hematíes que se deben contar en las *cuadrículas pequeñas* para dar el error estándar requerido para los diferentes niveles de reticulocitos. Se calcula con la siguiente fórmula: $\sigma = \sqrt{p(1 - p)/\lambda}$
donde p = número de reticulocitos en n cuadrados grandes ÷ (número de eritrocitos en *n* cuadrados pequeños × f); f = razón de los cuadrados grandes con respecto a los pequeños (es decir, 9), y λ = número total aproximado de células en *n* cuadrados grandes.

Métodos de fluorescencia para realizar un recuento reticulocitario

Los reticulocitos se pueden contar manualmente con un microscopio de fluorescencia en extensiones teñidas de forma adecuada[36]. Añadir 1 volumen de una solución de naranja de acridina (50 mg/100 ml de 9 g/l NaCl) a 1 volumen de sangre. Mezclar suavemente durante 2 min; hacer extensiones en un portaobjetos de cristal, secarlas rápidamente y examinarlas con el microscopio de fluorescencia. El ARN da una fluorescencia naranja-roja, mientras que la fluorescencia del material nuclear (ADN) es amarilla. Aunque la intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ARN, la luminosidad y el color de la fluorescencia fluctúan y la preparación se desvanece rápidamente al exponerla a la luz; se necesita también un microscopio de fluorescencia especial. Por tanto, este método no es apropiado para su uso rutinario en el recuento de reticulocitos.

La tinción con fluorescencia combinada con la citometría de flujo se ha desarrollado como un método para el recuento automatizado de reticulocitos (v. pág. 46).

Método de referencia manual

El método de referencia manual[37,38] es básicamente el mismo procedimiento que el método de rutina, con examen por

[j] Por ejemplo, Graticules Ltd., Morley Road, Tonbridge, Reino Unido.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

campo brillante o por contraste de fase de las extensiones teñidas supravitalmente. Los reticulocitos se identifican como eritrocitos no nucleados que contengan al menos dos partículas teñidas de azul o una partícula unida a una hebra filamentosa; hay que clasificar cada célula no nucleada en cada campo como un eritrocito o como un reticulocito. Se seleccionan tres extensiones sanguíneas apropiadas para cada muestra y se realiza el recuento moviéndose de campo a campo con un patrón en almena hasta que se haya contado un número suficiente de eritrocitos para satisfacer los requisitos de precisión (tabla 3.2). El objetivo es una variación del 2%, pero es poco práctico cuando la proporción de reticulocitos está en el rango de 0,01-0,02.

Intervalo normal del recuento de reticulocitos

El rango de reticulocitos en los adultos y los niños es de 50-100 × 10^9/l (0,5-2,5%). En lactantes (en sangre de cordón a término) es 2-5% (v. pág. 15).

TÉCNICAS AUTOMATIZADAS DE RECUENTO SANGUÍNEO

En la actualidad se utiliza una gran variedad de instrumentos automatizados para realizar los recuentos sanguíneos. Los instrumentos semiautomatizados requieren que algunos de los pasos intermedios (p. ej., la dilución de una muestra sanguínea) los realice un operador. Los instrumentos completamente automatizados sólo requieren que se les presente la muestra sanguínea apropiada. A menudo, los instrumentos semiautomatizados sólo miden un número pequeño de componentes (p. ej., RL y Hb). Los instrumentos multicanal completamente automatizados miden, por lo general, de 8 a 20 componentes, incluyendo algunas variables de las que no existe equivalente en las técnicas manuales. Los instrumentos automatizados tienen, por lo general, un alto nivel de precisión, que, para el recuento de las células y las técnicas de medición del tamaño de las células, es superior al alcanzable con las técnicas manuales. Si los instrumentos están cuidadosamente calibrados y su funcionamiento correcto se garantiza mediante procedimientos de control de calidad, generan unos resultados de las determinaciones que son, por lo general, exactos. Cuando la sangre tiene características anómalas, los resultados de uno o más parámetros pueden ser aberrantes; los instrumentos están diseñados para «señalar» los resultados incoherentes para su revisión posterior. Las características anómalas que generan recuentos imprecisos varían entre los distintos instrumentos, por lo que es importante que los operadores del instrumento se familiaricen con los tipos de resultados facticios que sus respectivos instrumentos tienen tendencia a producir.

Los contadores de células sanguíneas pueden tener procedimientos automatizados para el reconocimiento de las muestras (p. ej., por lectura de código de barras), para asegurar la mezcla adecuada de las muestras, para realizar la prueba de la muestra automáticamente y para detectar coágulos o muestras con un tamaño inadecuado. Lo ideal es que la toma de muestras sanguíneas se haga perforando el tapón de un tubo cerrado, de forma que las muestras con riesgo de infección puedan manejarse con la máxima seguridad.

Los laboratorios que realizan grandes cantidades de hemogramas al día necesitan contadores totalmente automatizados de sangre que sean capaces de obtener recuentos sanguíneos exactos y precisos, incluyendo recuentos plaquetarios y diferenciales, ya sea de tres componentes o de cinco a siete componentes. El rendimiento requerido varía con la carga de trabajo y el momento de llegada de las muestras sanguíneas al laboratorio pero, para la mayoría de los grandes laboratorios, se requiere una producción de 100 o más muestras por hora. El volumen de la muestra y la disponibilidad de un sistema «prediluido» tienen una particular importancia si el laboratorio recibe muchas muestras pediátricas.

La elección de un instrumento para un laboratorio concreto, así como para los centros de atención fuera del laboratorio (v. pág. 546), debe tener en cuenta la inversión de capital y los costes de funcionamiento, incluyendo el mantenimiento y los reactivos; el tamaño del instrumento; los requisitos de servicios como agua, aire comprimido, drenaje y suministro eléctrico con un voltaje estable; las alteraciones ambientales por generación de calor, vibración y ruido; cualquier influencia en el funcionamiento por la temperatura ambiente y por la humedad; los requisitos de almacenamiento para los, a menudo, voluminosos reactivos; la sencillez de manejo y el nivel probable de servicio que puede esperarse del fabricante.

Se ha publicado una guía práctica sobre los principios de los diversos sistemas[39] y existen directrices que ayudan en la elección de un instrumento adecuado para las necesidades de un laboratorio determinado y también para valorar sus prestaciones, comparándolas con las afirmaciones del fabricante, una vez instalado y utilizado en la práctica de rutina[40]. Para la elección del instrumento pueden ser de ayuda los informes publicados de las evaluaciones de los instrumentos; existen muchos de estos informes, incluyendo informes de la Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (anteriormente Medical Devices Agency) del Reino Unido y monografías relacionadas[39,41-43]. Algunos instrumentos semiautomatizados hacen una aspiración exacta de un volumen determinado de una muestra y así pueden realizar recuentos celulares absolutos y estimaciones precisas de la Hb. Sin embargo, la mayoría de los instrumentos automatizados actúan durante un período específico de tiempo en vez de sobre un volumen exacto de sangre, requiriendo por tanto calibraciones por medio de recuentos directos obtenidos por instrumentos contadores de células en un volumen definido de sangre diluida. Para algunas variables, los instrumentos los calibra el fabricante; sin embargo, otras requieren calibración en el laboratorio. Las características de funcionamiento de un instrumento varían con el tiempo, de forma que se necesita una recalibración, tanto cuando los procedimientos de control de calidad indican la necesidad de hacerlo como cuando se reemplazan ciertos componentes.

CONCENTRACIÓN DE HEMOGLOBINA

La mayoría de los contadores automatizados miden la hemoglobina mediante una modificación del método manual de la HiCN con un reactivo de cianuro o con un compuesto químico no peligroso como el lauril sulfato sódico, que evita los posibles peligros ambientales de la eliminación de grandes volúmenes de desechos con cianuro. Las modificaciones incluyen alteraciones en la concentración de los reactivos, en la temperatura y en el pH de la reacción. Se incorpora un detergente no iónico para garantizar una lisis celular rápida y para reducir la turbidez causada por las membranas celulares y los lípidos plasmáticos. Las mediciones de la absorbancia se hacen en un intervalo de tiempo prefijado tras la mezcla de la sangre y de los reactivos pero antes de que la reacción se complete.

RECUENTO DE ERITROCITOS

Los eritrocitos y otras células sanguíneas pueden contarse con sistemas basados en la impedancia en la abertura o en la tecnología de dispersión lumínica. Ya que se pueden contar rápidamente grandes cantidades de células, el nivel de precisión es elevado. En consecuencia, los recuentos electrónicos han dado al RE y a los índices eritrocitarios derivados de él (el VCM y la HCM) una relevancia clínica mucho mayor que la que tenían cuando sólo se disponía de un RE manual lento e impreciso.

SISTEMAS DE RECUENTO DE HEMATÍES

Recuento por impedancia

El recuento por impedancia, descrito por primera vez por Wallace Coulter en 1956[44], se basa en el hecho de que los eritrocitos son malos conductores de la electricidad, mientras que ciertos disolventes son buenos conductores; esta diferencia constituye la base de los sistemas de recuento que utilizan Beckman–Coulter, Sysmex, Abbott, Roche y muchos otros instrumentos.

Para contar los hematíes, se hace una dilución importante de la sangre en una solución de electrólitos tamponada. El caudal de esta muestra diluida se controla mediante un sifón de mercurio (como en el sistema Coulter original) o por el desplazamiento de un pistón estrechamente ajustado. El resultado es el paso de un volumen medido de la muestra a través de un tubo de abertura de dimensiones específicas (p. ej., 100 mm de diámetro y 70 mm de longitud). Por medio de una fuente constante de electricidad, se hace pasar una corriente continua entre dos electrodos: uno en la cubeta de la muestra o en la cámara que rodea el tubo de abertura y otro dentro del tubo de abertura. Cuando una célula sanguínea pasa por la abertura, desplaza una parte del líquido conductor e incrementa la resistencia eléctrica. Esto origina un cambio en el potencial entre los electrodos, que se mantiene mientras el eritrocito atraviesa la abertura; la altura de las pulsaciones eléctricas originadas indica el volumen de eritrocitos que están pasando. Dichas pulsaciones pueden mostrarse en la pantalla de un oscilógrafo. Las pulsaciones se llevan a un circuito con un umbral provisto de un discriminador de amplitud para seleccionar la altura mínima de las pulsaciones que se contarán (fig. 3.6). La altura de las pulsaciones se utiliza para determinar el volumen de los eritrocitos.

Dispersión lumínica

Los eritrocitos y otras células sanguíneas pueden contarse por medio de detectores electroópticos[45]. Una suspensión de células diluidas fluye a través de una abertura de forma que las células pasan en fila india delante de una fuente lumínica; la luz se dispersa debido a las células que atraviesan el rayo de luz. La luz dispersada es detectada por un fotomultiplicador o un fotodiodo, que la convierte en impulsos eléctricos que se acumulan y se cuentan. La cantidad de luz dispersada es proporcional al área celular y por tanto al volumen de las células, de forma que la altura de las pulsaciones eléctricas puede utilizarse para calcular el volumen celular. Los rayos láser coherentes de alta intensidad utilizados en los instrumentos actuales tienen cualidades ópticas superiores a las de la luz de tungsteno no coherente de los primeros instrumentos. El flujo enfundado hace que las células circulen en una corriente axial con un diámetro no mucho mayor que el de un eritrocito; la luz se puede enfocar de forma precisa en esta corriente celular. Los detectores electroópticos se utilizan para contar y medir los eritrocitos en los sistemas de Bayer-Technicon y para el recuento diferencial de leucocitos en muchos otros instrumentos.

FIABILIDAD DE LOS CONTADORES ELECTRÓNICOS

Los recuentos electrónicos son precisos, pero hay que prestar atención para que sean también exactos. El recuento re-

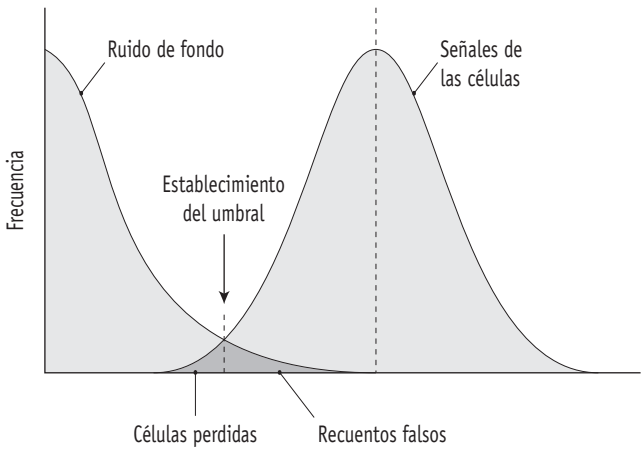


Figura 3.6. Efecto de la discriminación del umbral (eje horizontal) para separar las señales celulares del ruido de fondo.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

gistrado sobre la misma muestra puede variar de instrumento a instrumento e incluso entre diferentes modelos del mismo instrumento. La inexactitud puede introducirse por casualidad (es decir, dos células que atraviesen un orificio de forma simultánea y se cuenten como una sola célula, o bien por un impulso generado durante el tiempo muerto electrónico del circuito); por recirculación de las células que ya han sido contadas; por aglutinación de los eritrocitos (que causa una masa de células que se cuentan como una sola), y por el recuento de burbujas, gotas de lípidos, microorganismos o partículas extrañas como si fueran células. Las deficiencias en el mantenimiento pueden producir variaciones en el volumen aspirado o en el flujo. Los instrumentos monocanal pueden tener sus umbrales erróneamente definidos y los instrumentos multicanal estar incorrectamente calibrados.

Se puede aplicar una corrección estadística para las casualidades (corrección de la casualidad); en algunos instrumentos, ésta se realiza automáticamente por corrección electrónica. Los errores debidos a la casualidad pueden detectarse realizando una serie de mediciones en diversas diluciones de la misma muestra, trazando los datos en un papel gráfico y después extrapolando el gráfico a la línea de base para hallar el valor verdadero. Por otra parte, podemos evitar la corrección de la casualidad fijando las dimensiones y las características del flujo en la abertura que atraviesan las células, de forma que éstas sólo puedan pasar en fila india; esto puede conseguirse con un flujo enfundado o con un centrado hidrodinámico en el que la sangre diluida se inyecta en una funda de líquido cuando fluye por la zona de detección. Esto obliga a las células a atravesar por el centro la zona de detección en fila india y sin distorsiones. Es más eficaz la reducción de la casualidad con un flujo enfundado y con una luz enfocada de forma precisa en un detector electroóptico que en un contador de impedancia y además se necesita menos dilución de la muestra sanguínea[45]. Los impulsos eléctricos generados por la recirculación de las células se pueden eliminar por corrección electrónica; por otra parte, la recirculación de las células en la región de la abertura se puede evitar con el «flujo de barrido» en el que se dirige un chorro de diluyente contra la zona de la abertura para barrer las células y los desechos de la misma, evitando de esta manera que se recuenten las células y que los desechos se interpreten como células.

Los recuentos imprecisos a consecuencia de la aglutinación de los eritrocitos se deben, por lo general, a la acción de las aglutininas frías. Se reconocen como erróneos por la elevación asociada del VCM marcadamente facticia. El recuento correcto puede conseguirse precalentando la muestra sanguínea y, si es necesario, precalentando también al diluyente.

Un RE correcto y, sobre todo, una medición correcta del VCM dependen del uso de un diluyente apropiado. En los contadores de impedancia, el pH, la temperatura y la tasa de ionización tienen que estar normalizados y mantenerse constantes, porque los cambios alteran el campo eléctrico y pueden producir artefactos en el tamaño, la forma y la estabilidad de las células sanguíneas en el diluyente. Los diluyentes deben estar exentos de partículas y su recuento ser inferior a 50 partículas en el volumen medido. Hay que utilizar el diluyente correcto para cada instrumento concreto, pues puede que no sea posible el intercambio con otros diluyentes, incluso elaborados por el mismo fabricante. Cualquier laboratorio que utilice diluyentes distintos a los recomendados por el fabricante del instrumento debe asegurarse de que no están introduciendo un factor de error.

Para el recuento de los eritrocitos en los contadores monocanal simples el diluyente adecuado requiere un pH de 7,0-7,5 y una osmolalidad de 340 ± 10 mmol. Tanto el suero salino fisiológico (9 g/l de NaCl) como el suero salino tamponado con fosfato, que tienen las ventajas de la simplicidad y de la disponibilidad inmediata, pueden utilizarse como diluyentes de los eritrocitos, siempre que los recuentos se realicen inmediatamente tras la dilución para evitar los errores debidos a la esferocitosis. Las soluciones salinas comerciales (para uso intravenoso) están, generalmente, libres de partículas. En otras soluciones puede ser necesario filtrarlas con un filtro microporo de 0,22 o 0,45 mm para eliminar el polvo.

Determinación de los umbrales de discriminación

El RE exacto requiere que los umbrales se establezcan de forma tal que entren en el recuento todos los eritrocitos pero la mínima cantidad posible de otras células. Algunos contadores disponen de un umbral inferior pero no de uno superior, por lo que los leucocitos se incluyen en el «RE». Dado que el recuento leucocitario es, por lo general, muy bajo en relación con el RE, este hecho no tiene habitualmente una importancia práctica; sin embargo, se puede introducir un error apreciable si el recuento leucocitario es muy elevado, sobre todo si el paciente está también anémico. El establecimiento de un umbral inferior tiene una importancia considerable, pues es necesario para asegurar que los eritrocitos microcíticos se incluyan en el recuento sin que se cuenten también las plaquetas grandes.

Los actuales instrumentos multicanal, tanto los contadores por impedancia como los que utilizan la tecnología de dispersión lumínica, disponen de umbrales que pueden ser precalibrados por el fabricante o ajustados automáticamente, dependiendo de las características de las muestras sanguíneas individuales. Los instrumentos de impedancia monocanal capaces de realizar un RE directo precisan la fijación de umbrales tales que puedan separar los impulsos generados por los eritrocitos del ruido de fondo y de los impulsos generados por las plaquetas. Esto se realiza ajustando la corriente en la abertura y la amplificación del impulso. Un método simple consiste en diluir una muestra fresca de sangre y realizar recuentos sucesivos de la suspensión, mientras que se mueve progresivamente el control para el umbral inferior desde su posición máxima a la mínima. En la posición máxima, el recuento debería ser cero o próximo a cero e irse incrementando a medida que se reduce la amplitud. Los recuentos en cada posición del dial

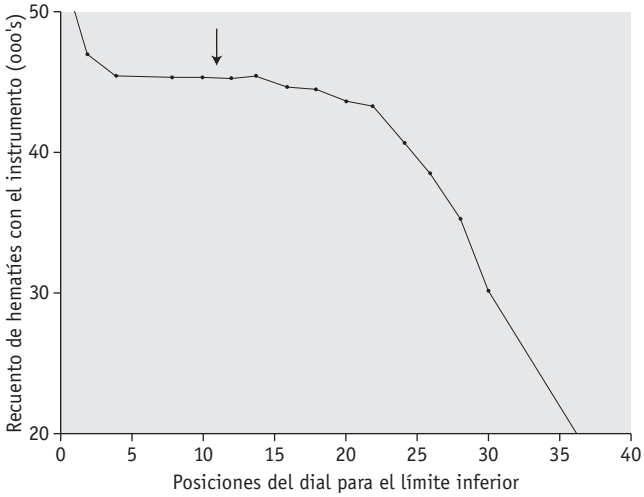


Figura 3.7. Método para establecer las condiciones de trabajo de los contadores celulares. El establecimiento correcto del umbral (en la flecha) está destinado a excluir los impulsos del ruido sin pérdida de los impulsos de la señal producidos por las células sanguíneas.

se representan en un papel gráfico aritmético (fig. 3.7). El punto correspondiente al umbral correcto se sitúa a la izquierda de la parte horizontal del gráfico antes de que la línea comience a descender. Es importante comprobar que el ajuste seleccionado es válido para las células microcíticas. El umbral puede definirse de forma más precisa para una muestra individual por medio de un analizador de la altura del impulso unido al sistema de recuento. El umbral mínimo está correctamente establecido si más allá de este punto hay menos del 0,5% de los recuentos en el pico (modo) de la curva de distribución del tamaño del impulso (v. fig. 3.6).

HEMATOCRITO Y VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO

Los modernos contadores automatizados de células sanguíneas calculan el Hto mediante una tecnología que tiene poca relación con el Hto obtenido por centrifugación. A veces es conveniente utilizar diferentes términos para distinguir las pruebas manuales de las automatizadas y, por esta razón, el International Council for Standardization in Haematology ha sugerido que se utilice el término «hematocrito» (Hto) para las mediciones automatizadas en lugar del de volumen del paquete de hematíes (del inglés PCV, *packed cell volume*). Sin embargo, hay que indicar que en el pasado, se han utilizado indistintamente los términos «volumen del paquete de hematíes» y «hematocrito» para el procedimiento manual.

Con los instrumentos automatizados, las obtenciones del RE, del Hto y del VCM están estrechamente interrelacionados. El paso de una célula a través de la abertura de un contador de impedancia o a través del rayo de luz de un instrumento de dispersión lumínica genera un impulso eléctrico cuya altura es proporcional al volumen celular. El número de impulsos generados permite la determinación del RE, como se ha descrito antes. El análisis de la altura del impulso nos sirve para determinar el VCM o el Hto. Si se computa la altura media del impulso, nos indicará el VCM y el hematocrito puede obtenerse multiplicando el VCM calculado por el RE. De forma similar, si se suman las alturas de los impulsos, la cifra nos indicará el Hto y, a su vez, el VCM puede obtenerse dividiendo el Hto por el RE.

Los instrumentos automatizados necesitan ser calibrados antes de determinar el Hto o el VCM. La calibración del Hto puede basarse en las determinaciones manuales del mismo. Por otra parte, el VCM puede calibrarse por medio de las alturas de los impulsos generados por cuentas de látex[k], células estabilizadas o algún otro elemento de calibración que contenga partículas de un tamaño conocido. Sin embargo, los eritrocitos humanos no fijados, que son bicóncavos y flexibles, no presentarán obligatoriamente las mismas características en un contador de células que las partículas de látex o las de algún otro elemento de calibración artificial. Los sistemas de impedancia de la abertura miden un volumen aparente que es mayor que el volumen real, ya que están influenciados por el «factor de la forma»[46]; este factor es menor de 1,1 para los eritrocitos jóvenes y flexibles; entre 1,1 y 1,2 para las células bicóncavas fijadas y alrededor de 1,5 para las esferas, ya sean células fijadas o esferas de látex[45,46].

El VCM y por tanto el Hto determinados por un contador automatizado variarán con determinadas características de las células que no sean las del volumen. Como se ha indicado antes, entre esas características se incluye la forma, que a su vez está determinada parcialmente por la flexibilidad. Con los contadores de impedancia, los eritrocitos normales con forma de disco se elongan hasta adoptar la forma de un cigarro a medida que atraviesan el orificio; esto se produce por la deformación en respuesta a la fuerza de cizallamiento, que ocurre en células con una flexibilidad normal. Las células con una concentración de hemoglobina reducida sufren una elongación mayor que las células normales; esto produce una reducción del «factor de la forma», así como una reducción de la altura del impulso en relación con el tamaño real de la célula y una subestimación del VCM. En cambio, las células con membranas anormalmente rígidas y las células, como los esferocitos, con una alta concentración de hemoglobina sufrirán menos deformación que las normales y el VCM estará sobreestimado. Los primeros instrumentos de dispersión lumínica también subestimaban el volumen de los eritrocitos con una concentración reducida de hemoglobina porque la dispersión de la luz resultaba afectada por la concentración de la hemoglobina[47]. Estos artefactos se ven incluso en eritrocitos normales con distinta concentración de hemoglobina, pero son más evidentes en los eritrocitos de pacientes con defectos en la síntesis de hemoglobina, como ocurre en los pacientes que tienen deficiencia de hierro. Los instrumentos de dispersión lumíni-

[k] BCR Existen preparaciones certificadas disponibles en el Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) (v. pág. 591)

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

ca han evolucionado para evitar artefactos de este tipo. Las células se redondean isovolumétricamente, de forma que sus características de dispersión lumínica son uniformes y deben seguir las leyes de la física. La dispersión de la luz provocada por cada célula individual se mide en dos ángulos: hacia delante (FSC o FSc) y lateralmente (SSC o SSc) con un ángulo de 90°, lo que permite el cómputo tanto de su volumen como de su concentración de hemoglobina[47]; la última medición se designa como la media de la concentración de hemoglobina celular (MCHC) para diferenciarla de la CHCM obtenida a partir de la Hb y del Hto. Si todas las mediciones son exactas, la MCHC y la CHCM deberían dar los mismos resultados, proporcionando así un mecanismo de control de calidad interno.

El VCM y el Hto automatizados tienen tendencia a generar ciertos errores que no ocurren o no son tan problemáticos con los métodos manuales. Entre ellos se incluyen los resultantes de los microcoágulos o del coagulado parcial de la muestra, la microcitosis extrema y la presencia de crioglobulinas o aglutininas frías; esta última es una causa relativamente frecuente de la elevación facticia del VCM, porque las acumulaciones de células se consideran, desde el punto de vista del tamaño, como si fueran células individuales. Al haber una subestimación del RE, el hematocrito está menos afectado, aunque también es inexacto. Es raro que las aglutininas calientes originen un problema similar. La morfología falciforme puede causar un incremento facticio en el VCM y en el Hto, mientras que las alteraciones en la osmolaridad del plasma que ocurren, por ejemplo en la hiperglucemia grave, causan también elevaciones facticias del VCM y del Hto[43,48,49].

ÍNDICES ERITROCITARIOS

Los índices eritrocitarios han sido tradicionalmente los parámetros calculados del VCM, la HCM y la CHCM; recientemente, se ha incluido también la amplitud de la distribución eritrocitaria (ADE) y, en algunos instrumentos, la amplitud de la distribución de hemoglobina (ADH). Estos índices son la base para la clasificación de las anemias y se han utilizado en diversas combinaciones para ayudar a distinguir entre la deficiencia de hierro y las talasemias[50–52]. Sin embargo, es importante hacer hincapié en que estas fórmulas pueden no tener consistencia entre los distintos instrumentos y que su uso proporciona únicamente una guía para el diagnóstico más probable. Cuando el diagnóstico es importante, como en la detección anterior a la concepción o prenatal de la talasemia, se requieren pruebas definitivas, incluso en pacientes cuyos índices eritrocitarios son más sugestivos de la deficiencia de hierro.

Volumen corpuscular medio

Como hemos descrito antes, en los sistemas automatizados, el VCM se mide directamente, pero en los contadores semiautomatizados el VCM se calcula dividiendo el Hto por el RE.

Así, por ejemplo, si el Hto es 0,45 (es decir, 0,45 l de eritrocitos por litro de sangre) y el RE es 5×10^{12} por litro,

$$\text{Volumen de una célula} = 0{,}45 \div 5 \times 10^{12} = 90 \text{ femtolitros (fl)}$$

Hemoglobina corpuscular media y concentración de la hemoglobina corpuscular media

La HCM se obtiene dividiendo la Hb entre el RE.

Así, por ejemplo, si hay 150 g de Hb y 5×10^{12} eritrocitos por litro,

$$\text{HCM} = 150 \div 5 \times 10^{12} = 3 \div 10^{11} \text{ g} = 30 \text{ picogramos (pg)}$$

La CHCM se calcula de la forma tradicional (v. pág. 30) a partir de la Hb y del Hto con instrumentos que miden el Hto y calculan el VCM, mientras que cuando el VCM se mide directamente y el Hto se calcula, la CHCM se obtiene del Hto, el VCM y el RE según la siguiente fórmula:

$$\text{CHCM (g/l)} = \frac{[\text{Hb (g/l)} \times 1.000]}{[\text{VCM (fl)} \times \text{RE} \times 10^{-12}/\text{l}]}$$

Por ejemplo, si la Hb es 150 g/l, el VCM es 90 fl y el RE es 5×10^{12}/l,

$$\text{CHCM} = 150 \times \frac{1.000}{90 \times 5} = 333 \text{ g/l}$$

A medida que se desarrollaron e introdujeron los contadores automatizados, se observó que la reducción en la CHCM, que con los métodos manuales había sido un indicador útil de la hipocromía en la deficiencia precoz de hierro, se había transformado en un indicador menos sensible del desarrollo de una deficiencia de hierro. La explicación de este hecho es compleja. En la deficiencia de hierro, no sólo hay una hipocromía real sino también un aumento del atrapamiento plasmático en la columna de eritrocitos en los tubos del microhematocrito, lo que aumenta el Hto y exagera la reducción de la CHCM. La reducción de la CHCM es por tanto un reflejo real de la hipocromía y en parte un artefacto. Cuando la CHCM se obtiene por contadores automatizados, no existe el artefacto del atrapamiento plasmático aumentado, pero los instrumentos son también menos sensibles para detectar una reducción real de la CHCM por la subestimación del tamaño de los eritrocitos hipocrómicos descrita anteriormente. Como la CHCM se calcula con la fórmula dada previamente, la subestimación del VCM conduce a una sobreestimación de la CHCM. De esta forma, la CHCM muestra pocas alteraciones a medida que las células se vuelven hipocrómicas. La MCHC, si disponemos de ella, es un equivalente de la CHCM medida de forma más directa. Nos da una mayor sensibilidad a la deficiencia de hierro, ya que la CHCM y la MCHC disminuyen a medida que se desarrolla la hipocromía[53].

VARIACIONES EN LOS VOLÚMENES ERITROCITARIOS: AMPLITUD DE LA DISTRIBUCIÓN ERITROCITARIA

Los instrumentos automatizados generan unos histogramas de distribución del volumen que permiten apreciar la presencia de más de una población de células. Dichos instrumentos pueden también evaluar el porcentaje de células situadas por encima y por debajo de unos umbrales determinados del VCM y «señalar» la existencia de un número aumentado de microcitos o de macrocitos. Tales mediciones pueden indicar la presencia de un aumento pequeño, aunque significativo, del porcentaje de microcitos o de macrocitos antes de que haya algún cambio en el VCM.

La mayoría de los instrumentos realizan también una medición cuantitativa de la variación en el volumen celular, un equivalente de la evaluación microscópica del grado de anisocitosis. Este nuevo parámetro se ha denominado «amplitud de la distribución eritrocítica». La ADE se obtiene por análisis de la altura del impulso y puede expresarse como la desviación estándar (en fl) o como el coeficiente de variación (CV) (%) de las mediciones del volumen eritrocítico. Los instrumentos actuales de Beckman-Coulter y de Bayer-Technicon expresan la ADE como la DE y los instrumentos de Sysmex la expresan como la DE o como el CV. El intervalo de referencia normal está en el orden del 12,8 ± 1,2% para el CV y de 42,5 ± 3,5 fl para la DE. Sin embargo, se han notificado intervalos con amplias diferencias; por tanto, es importante que los laboratorios determinen sus propios intervalos de referencia. Se ha visto que la ADE expresada como CV tiene algún valor para diferenciar entre la deficiencia de hierro (ADE habitualmente elevada) y los rasgos de talasemia (ADE habitualmente normal) y entre la anemia megaloblástica (ADE a menudo elevada) y otras causas de macrocitosis (ADE más a menudo normal).

VARIACIONES EN LA HEMOGLOBINIZACIÓN ERITROCITARIA: AMPLITUD DE LA DISTRIBUCIÓN DE LA HEMOGLOBINA

Los instrumentos que determinan la concentración de hemoglobina en los eritrocitos individuales proporcionan curvas de distribución de la concentración de hemoglobina y son capaces de «señalar» la presencia de cantidades elevadas de células hipocrómicas y de células hipercrómicas. El grado de variación de la hemoglobinización eritrocitaria se cuantifica como la amplitud de la distribución de la hemoglobina o ADH; corresponde al CV de las mediciones de la concentración de hemoglobina en las células individuales. El intervalo normal del 95% es 1,82-2,64. Dado que se ha determinado el volumen de los eritrocitos individuales, se puede distinguir entre los microcitos hipocrómicos, que indican un defecto en la síntesis de hemoglobina, y los macrocitos hipocrómicos, que a menudo corresponden a los reticulocitos[54]. Cuando existe un porcentaje elevado de células hipercrómicas, ello puede deberse a la presencia de esferocitos, de células contraídas irregularmente o de células falciformes.

RECUENTO LEUCOCITARIO TOTAL

El RL total se realiza en la sangre completa tras la lisis de los hematíes. Se necesita un agente lisante para destruir los hematíes y reducir la estroma eritrocitaria a un residuo que no origine una respuesta detectable en el sistema de recuento y que no afecte a los leucocitos, de forma que no se altere la capacidad del sistema para contarlos. Diversos fabricantes recomiendan reactivos específicos y en los instrumentos multicanal, que también realizan un recuento diferencial automatizado, el uso del reactivo recomendado es esencial. En un contador de impedancia monocanal sencillo, el líquido siguiente es aceptable:

Cetrimida, 20 g.
Formaldehído al 10% (en 9 g/l de NaCl), 2 ml.
Ácido acético glacial, 16 ml.
NaCl, 6 g.
Agua hasta 1 l de solución.

Existen instrumentos relativamente sencillos que determinan la Hb y el RL mediante mediciones consecutivas en una muestra sanguínea. El diluyente contiene un reactivo que lisa los hematíes y otro que convierte la hemoglobina en cianuro de hemoglobina. La Hb se mide por un método modificado de la HiCN y los leucocitos se cuentan mediante la tecnología de impedancia. Aparte de los reactivos especificados por los fabricantes, se puede utilizar un diluyente que contenga cianuro de potasio y ferrocianuro de potasio junto con bromuro de etilhexadecildimetilamonio[55,56].

Los instrumentos multicanal completamente automatizados realizan el RL mediante impedancia, tecnología de dispersión lumínica o ambos sistemas. Las partículas residuales en una muestra sanguínea diluida se cuentan tras la lisis eritrocitaria o, en caso de algunos instrumentos de dispersión lumínica, después de que los hematíes se hayan vuelto transparentes. Se establecen los umbrales para excluir las plaquetas normales del recuento, aunque se incluyan las plaquetas gigantes. Habitualmente se incluyen algunos o todos los eritrocitos nucleados presentes, de forma que cuando existen eritrocitos nucleados el recuento se aproxima más al RTCN que al RL.

Los RL automatizados disminuidos de forma facticia se producen en ocasiones como consecuencia de una aglutinación de los leucocitos, del almacenamiento prolongado de la muestra o de la existencia de células anormalmente frágiles (p. ej., en la leucemia). Los recuentos elevados de forma facticia son más habituales y son, generalmente, el resultado de una lisis insuficiente de los hematíes. Con determinados instrumentos, esto puede producirse con las células de los neonatos o ser consecuencia de la uremia o de la presencia de una hemoglobina anómala como la hemoglobina S o la hemoglobina C; los recuentos elevados

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

pueden ser también el resultado de microcoágulos, de aglomeraciones plaquetarias o de la presencia de una crioglobulina.

RECUENTO DIFERENCIAL AUTOMATIZADO

La mayoría de los contadores diferenciales automatizados actualmente disponibles utilizan la citometría de flujo incorporada en un contador de sangre total en vez de ser únicamente contadores diferenciales. Cada vez más, los contadores automatizados de células sanguíneas tienen la capacidad de realizar un recuento diferencial, proporcionando ya sea un recuento diferencial de tres componentes o de cinco a siete componentes. Los recuentos se realizan en sangre completa diluida en la que los eritrocitos se han lisado o se han vuelto transparentes. Un recuento diferencial de tres componentes asigna las células a las categorías denominadas habitualmente: *a)* «granulocitos» o «células grandes»; *b)* «linfocitos» o «células pequeñas», y *c)* «monocitos», «células mononucleares» o «células intermedias». En teoría, la categoría de los granulocitos incluye a los eosinófilos y a los basófilos, pero en la práctica es corriente que una proporción apreciable de células de estos tipos se excluya de la categoría de los granulocitos y se incluya en la de los monocitos[57].

Los recuentos diferenciales de cinco a siete componentes clasifican las células como neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos, y el recuento diferencial extendido puede incluir también a las grandes células inmaduras (compuestas por blastos y granulocitos inmaduros) y a los linfocitos atípicos (incluyendo los blastos pequeños). Los instrumentos automatizados que realizan recuentos diferenciales de tres componentes o de cinco a siete componentes son capaces de «señalar» o rechazar recuentos de la mayoría de las muestras con eritrocitos nucleados, mielocitos, promielocitos, blastos y linfocitos atípicos. En menor medida, los instrumentos que incorporan un recuento diferencial de tres componentes, aunque no sean capaces de enumerar los eosinófilos ni los basófilos, son capaces de señalar una proporción significativa de muestras que tengan un número elevado de alguno de estos tipos celulares.

Tanto los contadores de impedancia como los instrumentos de dispersión lumínica son capaces de realizar recuentos diferenciales de tres componentes a partir de un canal único; la categorización se basa en el volumen diferente de los diversos tipos de células después de la lisis parcial y de la contracción citoplasmática. La mayoría de los recuentos diferenciales de cinco a siete componentes requieren dos o más canales en los que se analizan el volumen celular y otras características por medio de diversas modalidades (tabla 3.3). Los análisis pueden depender únicamente del volumen y de otras características físicas de la célula o también de la unión de ciertos colorantes a los gránulos o de la actividad de enzimas celulares como la peroxidasa. Las tecnologías utilizadas para estudiar las características de la célula incluyen la dispersión lumínica y las mediciones de la absorbancia y de la impedancia con corrientes electromagnéticas de alta y baja frecuencia o con corrientes de radiofrecuencia. Las células pueden haber estado expuestas a agentes lisantes o a reacciones citoquímicas que hayan ocurrido antes del estudio de las características de la célula. Mediante el análisis de dos parámetros o con funciones discriminadoras más complejas se divide a las células en grupos que pueden compararse con la posición de los diversos grupos de leucocitos en la sangre normal. Los umbrales, algunos fijos y otros variables, diferencian a los grupos entre sí, permitiendo el recuento de las células en cada grupo.

Los recuentos diferenciales automatizados que utilizan la citometría de flujo clasifican muchas más células de lo que es posible con un recuento diferencial manual. Los recuentos automatizados son, por consiguiente, mucho más

Tabla 3.3. Contadores de sangre total automatizados con una capacidad de recuento diferencial de cinco o más componentes[a]

Instrumento y fabricante	Tecnología utilizada para el recuento diferencial
Coulter STKS, GEN-S, LH 700 series	Impedancia con corriente electromagnética de baja frecuencia Impedancia con corriente electromagnética de alta frecuencia Dispersión de luz láser
Sysmex SE series, XE2100	Impedancia con corriente continua de baja frecuencia Impedancia con corriente de radiofrecuencia
Bayer H series, Advia	Dispersión lumínica y absorbancia tras la reacción de la peroxidasa Dispersión lumínica en dos ángulos tras el despojamiento citoplasmático diferencial
Abbott Cell-Dyn 3500	Cuatro parámetros de dispersión lumínica: dispersión lumínica hacia delante, dispersión lumínica ortogonal, dispersión lumínica de ángulo estrecho y dispersión lumínica ortogonal despolarizada
Cobas Argos 5	Impedancia eléctrica con células intactas y tras el despojamiento citoplasmático diferencial. Absorbancia lumínica

[a] Además de los contadores sanguíneos enumerados aquí, hay un número creciente de instrumentos en el mercado que son capaces de proporcionar recuentos diferenciales completos utilizando diversas tecnologías.

precisos que lo recuentos manuales; sin embargo, con determinadas categorías celulares (específicamente monocitos y basófilos) el grado de precisión es algunas veces menor del que cabría esperar según el número de células contadas, lo que indica que tales células no se clasifican siempre de forma consecuente. La exactitud de los contadores automáticos es menos impresionante que su precisión. En todos los tipos de contadores, las características celulares inusuales o el envejecimiento de una muestra sanguínea pueden producir una mala clasificación de las células. Aunque la mayoría de las muestras que contienen células anómalas se «marcan», esto no siempre es así; es posible que la presencia de eritrocitos nucleados, granulocitos inmaduros, linfocitos atípicos y blastos (incluso en ocasiones cantidades bastante grandes de blastos) no genere una «alarma». No obstante, los observadores humanos que realizan un recuento diferencial manual de 100 células pueden también pasar por alto anomalías significativas. En general, los recuentos automatizados resultan favorecidos al compararlos con los recuentos manuales de rutina, especialmente si a los instrumentos se les asignan solamente dos funciones: la realización de recuentos diferenciales en muestras normales y la «señalización marca» de muestras anómalas. Si se señalan anomalías morfológicas, se debe realizar siempre el examen microscópico de la extensión sanguínea teñida.

Los sistemas instrumento-reactivo, que han sido desarrollados para permitir los recuentos diferenciales automatizados, a menudo incluyen algunos, pero no todos, los EN en el «RL». Así, en presencia de un número significativo de EN, el recuento total no es ni un «RL» verdadero ni un «RTCN» verdadero y los recuentos leucocitarios absolutos calculados a partir del total han de ser forzosamente un tanto erróneos. Esto difiere de la situación existente con los instrumentos anteriores, que incluían cualquier eritrocito nucleado en el «RL». Podría ser posible hacer alguna valoración de la proporción de los EN incluidos en el recuento total estudiando la salida gráfica del instrumento y hay algunos instrumentos que también identifican específicamente y cuentan estas células; de lo contrario, si se necesitan recuentos absolutos exactos de los diferentes tipos leucocitarios, sería necesario volver a los instrumentos anteriores para proporcionar el RTCN y corregir el RL por medio de un recuento diferencial.

Entre los instrumentos actualmente en uso que cuentan los EN y corrigen el RL de la interferencia con los EN se incluyen el Abbott Cell-Dyn 4000, el Sysmex XE2100, y el Beckman-Coulter LH750.

Al principio, muchos hematólogos preferían los contadores diferenciales basados en el reconocimiento de patrones en las extensiones sanguíneas teñidas, pero eran relativamente lentos y, como sólo podían contar un número pequeño de células en un tiempo razonable, la precisión del recuento automatizado no era mejor que la del recuento manual. Sin embargo, con el desarrollo de la tecnología computarizada y el uso de las redes neurales artificiales, tales instrumentos (p. ej., DiffMaster, CellVision AB, SE-223 70, Lund, Suecia) son capaces actualmente de proporcionar un recuento diferencial útil de las muestras sanguíneas que contienen células anómalas. Se pueden procesar y revisar hasta 30 extensiones por hora y se pueden reclasificar las células anómalas si ello es preciso.

Nuevos parámetros leucocitarios

Muchos instrumentos son capaces de «marcar» la presencia de linfocitos atípicos o «variantes» por rasgos como la alteración en el tamaño y por sus características de impedancia o de dispersión lumínica. Los contadores leucocitarios automatizados pueden analizar también las características celulares con tecnologías novedosas e identificar los tipos celulares por rasgos que difieren enormemente de los utilizados al examinar visualmente una extensión sanguínea. Por ejemplo, es posible identificar a los eosinófilos por la capacidad de sus gránulos de polarizar la luz[58] o de detectar una desviación a la izquierda o la presencia de blastos por la reducida dispersión lumínica de los núcleos de los granulocitos más inmaduros. Tienen también el potencial de generar una información que no es directamente similar a la obtenida por el recuento diferencial manual. Los instrumentos que incorporan una reacción citoquímica dan información sobre la actividad enzimática expresada como el índice de actividad peroxidasa media (MPXI, del inglés *mean peroxidase activity index*). Un aumento del MPXI se ha observado en las infecciones, en algunas mielodisplasias y en las leucemias, en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida) y en la anemia megaloblástica, mientras que una disminución del MPXI se produce en la deficiencia de peroxidasa en los neutrófilos heredada o adquirida[53,59,60].

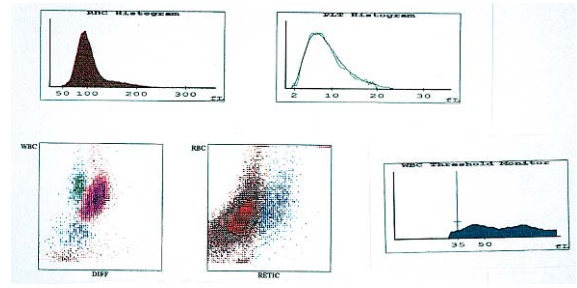
Tales mediciones pueden ser de utilidad clínica. Se ha observado que el porcentaje de granulocitos inmaduros medidos por el Sysmex XE2100, por ejemplo, es indicativo de una infección, aunque hay que subrayar que no lo es más que el recuento de neutrófilos absolutos[61]. Se ha sugerido que los parámetros utilizados para definir los tipos de leucocitos podrían también permitir la detección de la presencia del pigmento malárico como prueba de detección en las áreas donde hay prevalencia del paludismo[62,63].

GRÁFICOS DE LOS INSTRUMENTOS AUTOMATIZADOS

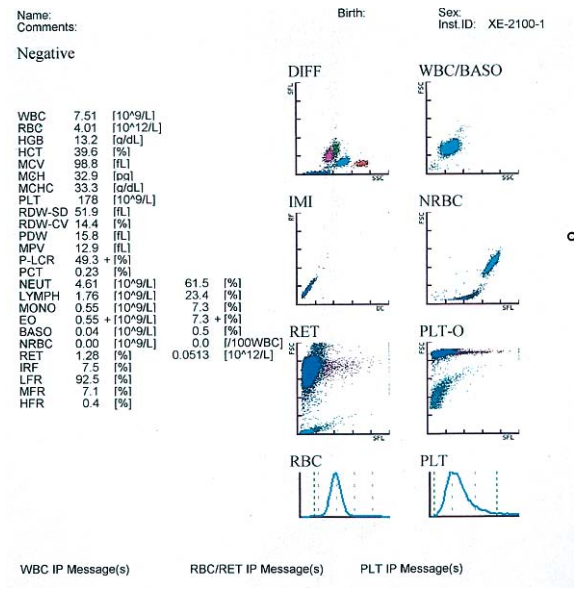
Los instrumentos completamente automatizados generan una visualización gráfica de muchos de los datos obtenidos.

Se muestran en un monitor en color y pueden ser impresos, ya sea en blanco y negro o en color. La inspección del gráfico puede dar mayor información que la disponible por la simple evaluación de los datos numéricos. La visualización en pantalla incluye generalmente histogramas del tamaño de los hematíes, los leucocitos y las plaquetas, y a veces histogramas de la concentración de la hemoglobina eritrocitaria y diagramas de dispersión del tamaño frente a

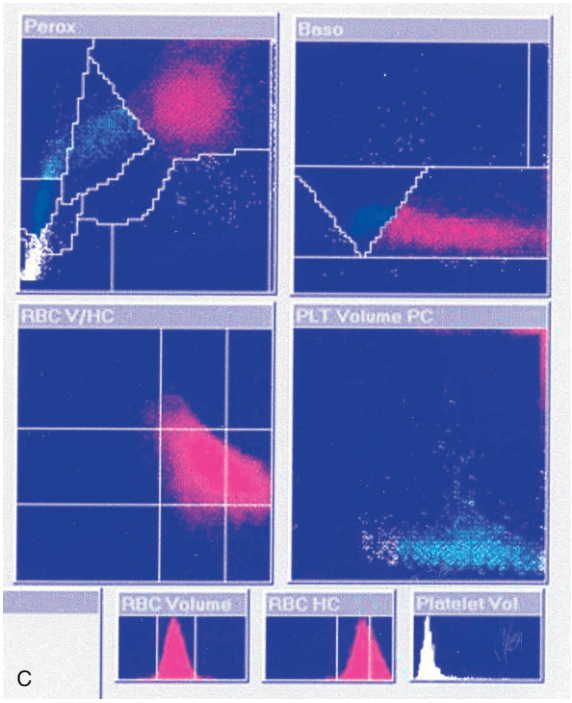
© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.



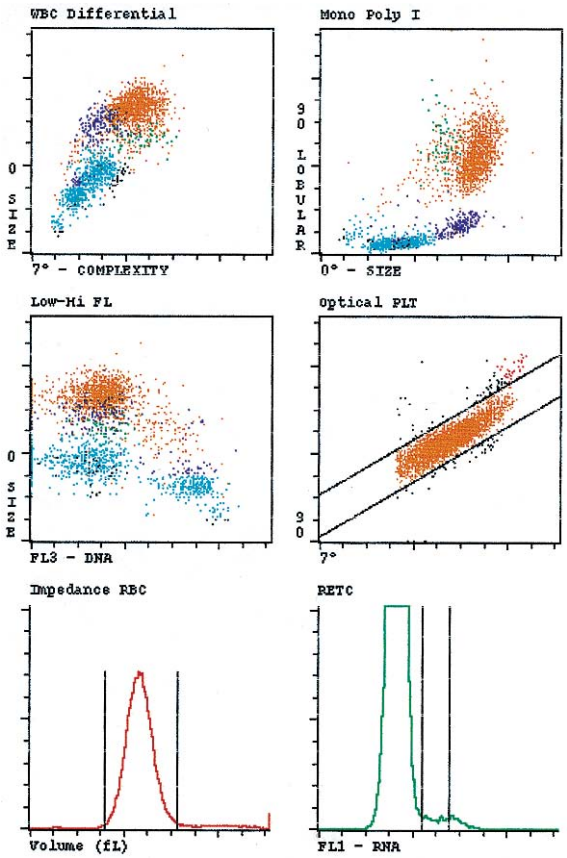
A



B



C



D

Figura 3.8. Patrones de impresión del recuento sanguíneo de algunos sistemas automatizados. A: Beckman-Coulter Gen S; B: Sysmex XE 2100; C: Bayer Advia, y D: Abbott Cell-Dyne 4000.

la concentración de la hemoglobina. Los recuentos diferenciales se representan gráficamente como diagramas de dispersión de dos variables o diagramas de dispersión de funciones discriminadoras obtenidas a partir de más de dos variables.

Las impresiones típicas de los histogramas o de los diagramas de dispersión de los instrumentos automatizados actuales se muestran en la figura 3.8.

RECUENTO PLAQUETARIO

Las plaquetas pueden contarse en la sangre total utilizando las mismas técnicas de detección eléctrica o electroóptica que se utilizan para contar los eritrocitos. Se necesita un umbral superior para separar las plaquetas de los hematíes y un umbral inferior para separar las plaquetas de los desechos y del ruido electrónico. Hay que evitar la recircu-

lación de los hematíes cerca de la abertura, pues los impulsos producidos pueden imitar a los generados por las plaquetas. Se utilizan tres técnicas para establecer los umbrales: *a)* se cuentan las plaquetas entre dos umbrales fijos (p. ej., entre 2 y 20 fl); *b)* se cuentan los impulsos entre umbrales fijos y posteriormente se ajustan a una curva y se extrapolan, de forma que las plaquetas que caigan fuera de los umbrales fijos se incluyan en el recuento computarizado, y *c)* los umbrales varían de forma automática, dependiendo de las características de las muestras sanguíneas individuales, para permitir la inclusión de eritrocitos microcíticos o fragmentados o de plaquetas gigantes.

Un nuevo método para contar plaquetas utiliza la citometría de flujo[64]. Las plaquetas en una muestra sanguínea se marcan con un anticuerpo monoclonal específico o con una combinación de anticuerpos combinados con fluorocromos y, midiendo la proporción hematíes:plaquetas, se puede calcular el recuento plaquetario. Los anticuerpos adecuados para los antígenos plaquetarios son CD41, CD42 y CD61. Este método basado en la utilización de CD41 y CD61 ha sido adoptado por el International Council for Standardization in Haematology como método de referencia[65]. Actualmente, existen algunos instrumentos que proporcionan un recuento plaquetario inmunológico automatizado para usos diagnósticos. Aunque estos instrumentos pueden contar plaquetas hasta niveles de 10×10^9/l o menores, hay que indicar que la precisión en estos niveles es a menudo escasa, con CV observados del 22-66% y con recuentos medios que difieren de manera apreciable entre los distintos instrumentos[66].

Los recuentos plaquetarios automatizados disminuidos de forma facticia pueden ser el resultado de plaquetas gigantes identificadas como hematíes, de cúmulos plaquetarios inducidos por el EDTA y de satelitismo (v. pág. 97). Los recuentos plaquetarios falsamente altos pueden deberse a eritrocitos fragmentados o notablemente microcíticos, a fragmentos celulares en la leucemia[67] o a bacterias o a hongos.

Se puede identificar a las plaquetas jóvenes con un alto contenido en ARN después de marcarlas con marcadores inmunológicos específicos[64,68-70]. Por analogía con el recuento de reticulocitos, se han denominado «plaquetas reticuladas» y se ha sugerido que su número aumentado en la circulación es una indicación sensible y precoz de regeneración de la trombopoyesis en la anemia aplásica. Sin embargo, ya que el intercambio de plaquetas entre la circulación y el bazo es constante, no está claro si su presencia en la sangre tiene el mismo significado que la de los reticulocitos.

Recuento plaquetario normal

Una persona normal tiene aproximadamente $150\text{-}400 \times 10^9$ plaquetas por litro de sangre. Los recuentos son algo mayores en las mujeres que en los hombres[71] y siguen un ciclo con recuentos ligeramente inferiores en el momento de la menstruación[72]. Se han observado menores recuentos plaquetarios en los indios americanos y en los africanos aparentemente sanos que en los caucásicos[73].

Volumen plaquetario medio

Para medir las plaquetas se pueden utilizar las mismas técnicas que para medir los hematíes. El volumen plaquetario medio calculado (VPM) depende mucho de la técnica de medición y de la duración y condiciones del almacenamiento anteriores a la realización de las pruebas sanguíneas. Cuando el VPM se mide con la tecnología de impedancia, se ha observado que, en los sujetos normales, varía inversamente con el recuento plaquetario. Si se extrapola esta curva, encontramos que los datos se ajustan a la curva extrapolada cuando la trombocitopenia se debe a una destrucción periférica de las plaquetas; sin embargo, el VPM es inferior al previsto cuando la trombocitopenia se debe a una anemia megaloblástica o a una insuficiencia de la médula ósea[74]. El VPM es generalmente mayor que el previsto en los trastornos mieloproliferativos, pero la diferenciación entre la trombocitemia esencial y la trombocitosis reactiva con esta premisa no ha tenido mucho éxito.

Otros parámetros plaquetarios que pueden ser computados por los contadores automatizados son la amplitud de la distribución plaquetaria (ADP), que es una medida de la anisocitosis plaquetaria, y el «plaquetocrito», que es el producto del VPM por el recuento plaquetario y que, por analogía con el hematocrito, puede contemplarse como un indicador del volumen de las plaquetas circulantes por unidad de volumen de sangre. Se ha observado que la ADP tiene cierta utilidad para distinguir la trombocitemia esencial (aumento de la ADP) de la trombocitosis reactiva (ADP normal). El plaquetocrito no parece aportar ninguna información de valor clínico.

RECUENTO DE RETICULOCITOS

Los recuentos automatizados de reticulocitos se basan en la combinación de diversos colorantes y fluorocromos con el ARN de los reticulocitos[34,75]. Tras la unión con el colorante, las células fluorescentes pueden contarse utilizando un citómetro de flujo. La mayoría de los contadores sanguíneos completamente automatizados incorporan actualmente la capacidad para contar reticulocitos, de forma que ya no es necesaria la utilización de un contador de sólo reticulocitos ni el uso de un citómetro de flujo de uso general. El National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) en colaboración con el ICSH ha publicado una norma internacional para este método[38]. Los colorantes utilizados en los diferentes sistemas incluyen la auramina O (Sysmex), el naranja de tiazol (ABX) y el CD4K 530 (Abbott), así como colorantes no fluorescentes como la oxazina 750 (Bayer-Technicon) y el tradicional nuevo azul de metileno (Beckman-Coulter, Abbott).

Tras la tinción, es necesario separar los reticulocitos de los hematíes no teñidos y, como los colorantes también se combinan con el ADN de las células nucleadas, hay que excluir también estas células. El umbral para esta exclusión está determinado por la intensidad de la fluorescencia y el

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

tamaño de las partículas. Aunque la separación entre los reticulocitos y los hematíes maduros no siempre está bien delimitada, los recuentos automatizados de reticulocitos se correlacionan bien con los recuentos manuales de éstos, pero los recuentos absolutos pueden diferir porque los recuentos automatizados dependen de las condiciones de la incubación y del método de calibración del instrumento[75]. La precisión es muy superior a la de los recuentos manuales ya que se cuentan muchas más células y se elimina el elemento subjetivo inherente al reconocimiento de reticulocitos tardíos. La inclusión de algunos leucocitos y plaquetas y, menos a menudo, de cuerpos de Howell-Jolly o de parásitos del paludismo en el recuento de «reticulocitos» son fuentes potenciales de inexactitud.

Los recuentos automatizados de reticulocitos son bastante estables en la sangre almacenada durante 1-2 días a temperatura ambiente o hasta 3-5 días a 4 °C.

Fracción de reticulocitos inmaduros

Los instrumentos completamente automatizados proporcionan una medida de los diversos grados de maduración de los reticulocitos ya que los reticulocitos más inmaduros, producidos cuando los niveles de eritropoyetina están elevados, tienen más ARN y emiten una fluorescencia más fuerte que los reticulocitos maduros normalmente presentes en la sangre periférica. Los parámetros que indican la inmadurez de los reticulocitos tienen una trascendencia clínica potencial. Por ejemplo, un aumento en la intensidad de la fluorescencia media, indicativa de la presencia de reticulocitos inmaduros, se ha observado como un signo precoz de implante del injerto tras un trasplante de médula ósea.

Las características de la producción de reticulocitos en los diferentes tipos de anemias pueden apreciarse especialmente cuando se utiliza un gráfico de salida de dos variables que relaciona la intensidad de la fluorescencia con el recuento de reticulocitos[34]. Como se ha descrito antes, un recuento total bajo con una fracción de reticulocitos inmaduros (FRI) relativamente elevada es indicativo de una médula que se está repoblando, mientras que una reticulocitopenia con una FRI baja es típica de una anemia aplásica grave o de una insuficiencia renal. El recuento total elevado junto con una FRI alta se produce en la hemólisis aguda y en la pérdida sanguínea, mientras que un recuento total bajo o normal con una FRI elevada se encuentra en las diseritropoyesis y en la respuesta precoz a los hematínicos[76-78]. La presencia de reticulocitos con una fluorescencia elevada señala también el comienzo de la respuesta cuando se trata la anemia aplásica grave con terapia inmunosupresora[76] y es una indicación fiable de regeneración hemopoyética tras la quimioterapia ablativa de la médula. En algunos estudios, aunque no en todos, se ha encontrado también que la FRI elevada es útil para predecir el tiempo óptimo para recoger progenitores hematopoyéticos[79]. Se ha sugerido la utilización de un recuento total normal con una FRI inesperadamente elevada en los atletas como método para detectar el «dopaje» con eritropoyetina[80]. También puede ser útil para decidir si una anemia macrocítica es megaloblástica o no megaloblástica[81].

Recuento normal de reticulocitos

El recuento de reticulocitos normal en los hombres o en las mujeres es: 50–100 × 10^9/l (0,5–2,5%).

Sin embargo, los intervalos de referencia notificados para los recuentos automáticos de reticulocitos varían considerablemente entre los distintos métodos y es, por tanto, importante que los laboratorios establezcan sus propios valores.

CALIBRACIÓN DE LOS CONTADORES AUTOMATIZADOS DE CÉLULAS SANGUÍNEAS

Se recomiendan los siguientes métodos para la calibración de un contador automatizado de células sanguíneas[82,83]:

1. Utilización de muestras de sangre fresca normal a los que se hayan asignado valores para la Hb, el Hto, el RE, el RL y el recuento plaquetario por métodos de referencia normalizados.
2. Utilización de un agente calibrador estable (ya sea sangre conservada o un sustituto) al que se le hayan asignado los valores apropiados para el instrumento en cuestión por comparación con sangre fresca normal.
3. Utilización de un agente calibrador comercial con unos valores asignados adecuados para el instrumento en cuestión.

Por razones de conveniencia y de economía, los materiales de control se utilizan habitualmente como calibradores; no obstante, esta práctica no se recomienda. Tales materiales no tienen la suficiente estabilidad para servir como calibradores y sus valores establecidos son, a menudo, aproximaciones no asignadas por los métodos de referencia. Están diseñados para dar resultados de las pruebas dentro de un intervalo establecido y en un período establecido, más que un resultado específico.

El procedimiento para asignar valores a las muestras frescas de sangre e indirectamente a un calibrador estable es el siguiente:

1. Se obtienen 4 ml de muestras sanguíneas de tres voluntarios hematológicamente normales y se anticoagulan con K_2-EDTA.
2. El valor de la Hb se asigna utilizando el método de la cianmetahemoglobina y la media de dos mediciones.
3. El Hto se asigna por el método del microhematocrito, tomando la media de las mediciones de cuatro tubos de hematocrito.
4. El RE se asigna realizando recuentos con un contador monocanal de impedancia en la abertura capaz de realizar un recuento directo de células; se utiliza la media de dos diluciones, cada una de las cuales se cuenta dos veces.

5. El VCM se asigna por cálculo a partir del RE y del Hto.
6. El RL se asigna realizando recuentos con un instrumento monocanal de impedancia en la abertura capaz de realizar recuentos directos de células; se utiliza la media de dos diluciones, cada una de las cuales se cuenta dos veces.
7. El recuento plaquetario se asigna utilizando un citómetro de flujo capaz de medir el cociente entre hematíes y plaquetas; el recuento plaquetario se calcula a partir de este cociente y de un RE medido de forma independiente. Cuando se disponga de anticuerpos monoclonales fluorescentes, se debe utilizar el método de referencia del ICSH/ISLH[65]. En las preparaciones que van a utilizarse como calibrador del recuento diferencial leucocitario o del recuento de reticulocitos, se asignan los valores por los métodos manuales de referencia[30,37] según se describe en las páginas 30 y 36, respectivamente.

Para calibrar el contador automatizado directamente a partir de las tres muestras de sangre fresca, hacer dos recuentos en cada nuestra y tomar las medias. Si los recuentos medidos difieren de los asignados, recalibrar el contador de forma adecuada.

Para calibrar un elemento calibrador estable, realizar dos recuentos en el calibrador y en cada muestra de sangre fresca utilizando el instrumento automatizado, A, y tomar las medidas. A partir de la razón entre los resultados de la prueba en sangre fresca y los del calibrador, asignar los valores corregidos al calibrador utilizando los siguientes cálculos:

Valor corregido del calibrador =

$$A_c \times \sqrt[3]{\frac{D_{F1}}{A_{FI}} \times \frac{D_{F2}}{A_{F2}} \times \frac{D_{F3}}{A_{F3}}}$$

donde:

A_C = medición del calibrador con el contador automatizado.
A_F = medición de las sangres frescas (1, 2 y 3) con un contador automatizado.
D_F = medición directa de las sangres frescas (1, 2 y 3).

Hay que tener mucho cuidado para garantizar que las mediciones iniciales en la sangre fresca sean tan exactas como sea posible. Las diluciones deben hacerse con pipetas calibradas individualmente y con matraces volumétricos de tipo A. El contador de células debe calibrarse como se describe en la página 38, con una razón señal-ruido mayor de 100:1 y con corrección del recuento para la casualidad. Los detalles de los procedimientos que se deben utilizar han sido descritos por el International Committee for Standardization in Haematology[84]. El ICSH[40] ha publicado también los procedimientos para la verificación por parte de los usuarios de las prestaciones de los analizadores multicanal; en los Estados Unidos lo ha hecho el National Committee for Clinical Laboratory Standards[85].

ALARMAS EN LOS RECUENTOS SANGUÍNEOS AUTOMATIZADOS[86,87]

Las «alarmas» hacen referencia a una señal que indica que el espécimen analizado puede tener una anomalía significativa porque una o más de las variables del recuento sanguíneo están fuera de los límites especificados (habitualmente 2 DE) o que existe una anomalía cualitativa que requiere una comprobación del control de calidad y/o una investigación adicional. Habitualmente incluye una revisión de la extensión sanguínea. Aunque teóricamente es deseable que cualquier recuento sanguíneo incorpore un examen de la extensión teñida, las crecientes cargas de trabajo, que requieren una racionalización del tiempo y de la rentabilidad, así como el uso de analizadores automáticos que notifican los recuentos diferenciales leucocitarios en cada espécimen muestra, cuestionan la posibilidad de hacer una extensión de cada muestra. En consecuencia, hay pocas extensiones sanguíneas que se miren al microscopio. Por tanto, la decisión de cuándo realizar, teñir y examinar una extensión sanguínea debe tener en cuenta las alarmas y la necesidad de asegurar la fiabilidad analítica. Esto incluye la comprobación de cualquier cambio significativo a partir de un recuento reciente previo (comprobación delta), así como cualquier circunstancia clínica específica. A continuación se da una guía para esta selección.

Petición del recuento sanguíneo: ¿Es la primera vez que se hace un recuento o es un recuento repetido?
Primera vez que se hace el recuento: ¿Es una prueba de detección rutinaria o entra en una categoría especial?

Si es rutinaria: informe del analizador sólo para un recuento sanguíneo. Si aparece alguna alarma **se necesitará hacer una extensión sanguínea.**
Si es una categoría especial: **se requiere una extensión sanguínea:**

1. Pacientes con enfermedad sanguínea diagnosticada.
2. Pacientes en tratamiento con radioterapia y/o quimioterapia.
3. Neuropatía.
4. Neonatos.
5. Unidad de cuidados intensivos.
6. Si se han solicitado también pruebas especiales para: mononucleosis infecciosa, anemia hemolítica, enzimopatía, hemoglobinas anómalas.
7. Si los detalles clínicos en el formulario indican linfoadenopatía, esplenomegalia o ictericia, o sugieren la posibilidad de leucemia o linfoma.
8. Petición específica del clínico.

Recuento repetido: **se requiere una extensión sanguínea:**

1. Comprobación delta positiva al compararlo con un registro previo.
2. Cualquier señal que aparezca en el recuento presente.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

3. En todas las ocasiones en pacientes con enfermedades sanguíneas conocidas, en los neonatos y cuando sean específicamente solicitadas por los clínicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Zijlstra WG, van Kampen EJ 1960 Standardization of hemoglobinometry. I. The extinction coefficient of hemiglobincyanide at l = 540mm: e540HiCN. Clinica Chimica Acta 91:719-726.
2. International Committee for Standardization in Haematology 1996 Recommendations for Reference Method for Haemoglobinometry in Human Blood (ICSH Standard 1995) and Specifications for International Haemiglobincyanide Standard, 4th ed., Journal of Clinical Pathology 49, 271-274.
3. Vanzetti G 1966 An azide-methemoglobin method for hemoglobin determination in blood. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 67:116-126.
4. Oshiro I, Takenaka T, Maeda J 1982 New method for hemoglobin determination by using sodium lauryl sulfate (SLS). Clinical Biochemistry 15:83-88.
5. Lewis SM, Garvey B, Manning R, et al 1991 Lauryl sulphate haemoglobin: a non-hazardous substitute for HiCN in haemoglobinometry. Clinical and Laboratory Haematology 13:279-290.
6. Zander R, Land W, Wolf HU 1984 Alkaline haematin D-575, a new tool for the determination of haemoglobin as an alternative to the cyanhaemiglobin method. I. Description of the method. Clinical Chimica Acta 136:83-93
7. Wolff HU, Land W, Zander R 1984 Alkaline haematin D-575, a new tool for the determination of haemoglobin as an alternative to the cyanhaemiglobin method. 11. Standardization of the method using pure chlorohaemin. Clinical Chimica Acta 136:95-104.
8. Lema OE, Carter JY, Arube PA et al 1994 Evaluation of the alkaline haematin D-575 method for hamoglobin estimation in east Africa. Bulletin of World Health Organization 72:937-941.
9. van Assendelft OW, Zijlstra WG 1989 Observations on the alkaline haematin/detergent complex proposed for measuring haemoglobin concentration. Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry 27:191-195.
10. Van Assendelft OW, Buursma A, Zijlstra WG 1996 Stability of haemiglobincyanide standards. Journal of Clinical Pathology 49:275-277
11. Van Kampen EJ, Zijlstra WG 1983 Spectrophotometry of hemoglobin and hemoglobin derivatives. Advances in Clinical Chemistry 23:199-257.
12. Matsubara T, Okuzono H, Senba U 1979 Modification of Van Kampen-Zijlstra's reagent for the hemiglobincyanide method. Clinica Chimica Acta 93:163-164.
13. Kinoshita Y, Yamane T, Takubo T et al 2002 Measurement of hemoglobin concentrations using the Astrim noninvasive blood vessel monitoring apparatus. Acta Haematologica 108:109-110.
14. Rendell M, Anderson E, Schlueter W et al 2003 Determination of hemoglobin levels in the finger using near infra-red spectroscopy. Clinical and Laboratory Haematology 25:93-97.
15. International Council for Standardization in Haematology 1980 Recommendations for reference method for determination by centrifugation of packed cell volume of blood. Journal of Clinical Pathology 33:1-2.
16. World Health Organization 2000 Recommended method for the determination of packed cell volume by centrifugation (Prepared by Expert Panel on Cytometry of the International Council for Standardization in Haematology) Document WHO/DIL/00.2:1-9, WHO, Geneva.
17. Bryner MA, Houwen B, Westengard J, et al 1997 The spun haematocrit and mean red cell volume are affected by changes in the oxygenation state of red blood cells. Clinical and Laboratory Haematology 19:99-103.
18. International Committee for Standardization in Haematology 1980 Recommended methods for measurement of red-cell and plasma volume. Journal of Nuclear Medicine 21:793-800.
19. England JM, Walford DM, Waters DAW 1972 Reassessment of the reliability of the haematocrit. British Journal of Haematology 23:247-256.
20. Pearson TC, Guthrie DL 1982 Trapped plasma in microhematocrit. American Journal of Clinical Pathology 78:770-772.
21. Expert Panel on Cytometry of the International Council for Standardization in Haematology 2001 Recommendations for reference method for the packed cell volume (ICSH Standard). Laboratory Hematology 7:148-170.
22. Bull BS, Fujimoto K, Houwen B et al 2003 International Council for Standardization in Haematology (ICSH) Recommendations for "surrogate reference" method for the packed cell volume. Laboratory Hematology 9:1-9.
23. Rothenberg ME 1998 Eosinophilia. New England Journal of Medicine 338:1592-1699.
24. Uhrbrand H 1958 The number of circulating eosinophils: normal figures and spontaneous variations. Acta Medica Scandinavica 160:99-104.
25. Brito-Babapulle F 2003 The eosinophilias, including the idiopathic hypereosinophilic syndrome. British Journal of Haematology 121:203-223.
26. Gilbert HS, Ornstein L 1975 Basophil counting with a new staining method using Alcian blue. Blood 46:279-286.
27. Mettler L, Shirwani D 1974 Direct basophil count for timing ovulation. Fertility and Sterility 25:718-723.
28. Mathy KA, Koepke JA 1974 The clinical usefulness of segmented vs stab neutrophil criteria for differential leucocyte counts. American Journal of Clinical Pathology 61:947-958.
29. Gombos M, Bienkowski R, Gochman R, et al 1998 The absolute neutrophil count: Is it the best indicator for occult bacteraemia in infants? American Journal of Clinical Pathology 109:221-225.
30. National Committee for Clinical Laboratory Standards 1992 Reference leukocyte differential count (proportional) and evaluation of instrument methods. Approved standard. NCCLS document H20-A. NCCLS, Wayne, PA.
31. Hubl W, Wolfbauer G, Andert S et al 1997 Towards a new reference method for the leukocyte five-part differential. Cytometry 30:72-84.
32. Fujimoto H. Sakata T, Hamaguchi Y et al 2000 Flow cytometric method for enumeration and classification of reactive immature granulocyte populations. Cytometry 42:371-378.
33. Groom AC, Schmidt EE 1990 Microcirculatory blood flow through the spleen. In AJ Bowdler (ed) The spleen: structure, function and clinical significance, p 45-102. Chapman and Hall, London.
34. D'Onofrio G, Zini G, Rowan RM 2002 Reticulocyte counting: methods and clinical applications. In: RM Rowan, OW van Assendelft, FE Preston (eds) Advanced laboratory methods in haematology, pp. 78-126. Arnold, London.

35. Wittekind D, Schulte E 1987 Standardized azure B as a reticulocyte stain. Clinical and Laboratory Haematology 9:395-398.
36. Jahanmehr SAH, Hyde K, Geary CG, et al 1987 Simple technique for fluorescence staining of blood cells with acridine orange. Journal of Clinical Pathology 40:926-929
37. International Council for Standardization in Haematology 1998 Proposed reference method for reticulocyte counting based on the determination of the reticulocyte to red cell ratio. Clinical and Laboratory Haematology 20:77-79.
38. National Committee for Clinical Laboratory Standards and International Council for Standardization in Haematology 2004 Methods for reticulocyte counting (automated blood cell counters, flow cytometry, and supravital dyes); approved guideline, 2nd ed., Document H44-A2. Vol 24 (8). NCCLS, Wayne PA.
39. Groner W, Simson E 1995 Practical guide to modern haematology analyzers. Wiley, Chichester.
40. International Council for Standardization in Haematology 1994 Guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting and cell marker applications. Clinical and Laboratory Haematology 16:157-174.
41. Bain BJ 2000 Blood cells: a practical guide, 3rd ed., Blackwell Science Oxford.
42. Simson E, Ross DW, Kocher WD 1988 Atlas of automated cytochemical hematology. Technicon, Tarrytown, NY.
43. Houwen B 2002 The blood count. In: RM Rowan, OW van Assendelft, FE Preston (Eds) Advanced laboratory methods in haematology, pp. 19-44. Arnold, London.
44. Coulter WH 1956 High speed automatic blood cell counter and cell size analyser. Proceedings of National Electronics Conference 12:1034-1040.
45. Thom R 1990 Automated red cell analysis. Bailliere's Clinical Haematology 3:837-850.
46. England JM, van Assendelft OW 1986 Automated blood counters and their evaluation. In: Rowan RM, England JM (eds) Automation and quality assurance in haematology. Blackwell Scientific, Oxford.
47. Mohandas N, Kim YR, Tycko DH, et al 1986 Accurate and independent measurement of volume and hemoglobin concentration of individual red cells by laser scattering. Blood 68:506-513.
48. Evan-Wong L, Davidson RJ 1983 Raised Coulter mean corpuscular volume in diabetic ketoacidosis, and its underlying association with marked plasma hyperosmolarity. Journal of Clinical Pathology 36:334-336.
49. Holt JT, DeWandler MJ, Arvan DA 1982 Spurious elevation of the electronically determined mean corpuscular volume and hematocrit caused by hyperglycemia. American Journal of Clinical Pathology 77:561-567
50. Bentley SA, Ayscue LH, Watson JM, et al 1989 The clinical utility of discriminant functions in the differential diagnosis of microcytic anemias. Blood Cells 15:575-582.
51. Lafferty JD, Crowther MA, Ali MA, et al 1996 The evaluation of various mathematical RBC indices and their efficacy in discriminating between thalassemic and non-thalassemic microcytosis. American Journal of Clinical Pathology 106:201-295.
52. Green R, King R, 1989A new red cell discriminant incorporating volume dispersion for differentiating iron deficiency anemia from thalassemia minor. Blood Cells 15:481-491.
53. Ross DW, Bentley SA 1986 Evaluation of an automated hematology system (Technicon H-1). Archives of Pathology and Laboratory Medicine 110:803-808.
54. Bain BJ, Cavill I 1993 Hypochromic macrocytes—are they reticulocytes? Journal of Clinical Pathology 46:963-964.
55. Ballard BCD 1972 Lysing agent for the Coulter S. Journal of Clinical Pathology 25:460.
56. Skinnider LF, Musglow E 1972 A stromatolysing and cyanide reagent for use with the Coulter Counter Model S. American Journal of Clinical Pathology 57:537-538.
57. Bain BJ 1986 An assessment of the three population differential count on the Coulter Model S Plus IV. Clinical and Laboratory Haematology 8:347-359.
58. Cornbleet PJ, Myrick D, Judkins S, et al 1992 Evaluation of the CELL-DYN 3000 differential. American Journal of Clinical Pathology 98:603-614.
59. D'Onofrio G, Zini G, Tommasi M, et al 1992 Anomalie ultramorpholigiche dei granulociti neutrofili nelle infezioni da virus HIV. Atti del V Incontro del Club Utilizzatori Sistemi Ematologici Bayer-Technicon, Montecatini Terme, 1991.
60. Taylor C, Bain BJ 1991 Technicon H1 automated white cell parameters in the diagnosis of megaloblastic erythropoiesis. European Journal of Haematology 46:248-249.
61. Ansari-Lari MA, Kickler TS and Borowitz MJ 2003 Immature granulocyte measurement using the Sysmex XE-2100. American Journal of Clinical Pathology 120:795-799
62. Fourcade C, Casbas MJ, Belaouni H et al 2004 Automated detection of malaria by means of the haematology analyser Coulter GEN.S. Clinical and Laboratory Haematology 26:367-372.
63. Hänscheid T, Pinto BG, Cristino JM, et al 2000 Malaria diagnosis with the haematology analyser Cell-Dyne 3500: what does the instrument detect? Clinical and Laboratory Haematology 22:259-261.
64. Ault KA 2001 The clinical utility of flow cytometry in the study of platelets. Seminars in Hematology 38:160-168.
65. ICSH (Expert Panel on Cytometry) and International Society of Laboratory Hematology (ISLH) 2001 Platelet counting by the PLT/RBC ratio—a reference method. American Journal of Clinical Pathology. 115:460-464.
66. Parker-Williams J 2003 Immunoplatelet counting: platelet transfusions. British Journal of Haematology 123:750-751.
67. van der Meer W, MacKenzie MA, Dinnisson JWB, et al 2003 Pseudoplatelets: a retrospective study of their incidence and interference with platelet counting. Journal of Clinical Pathology 56:772-774.
68. Takubo T, Yamane T, Hino M, et al 1998 Usefulness of determining reticulated and large platelets in idiopathic thrombocytopenic purpura. Acta Haematologica 99:109-110.
69. Macchi I, Chamlian V, Sadoun A et al 2002 Comparison of reticulated platelet count and mean platelet volume determination in the evaluation of bone marrow recovery after aplastic chemotherapy. European Journal of Haematology 69:152-157.
70. Robinson MSC, Mackie IJ, Machin SJ, Harrison P 2000 Two colour analysis of reticulated platelets. Clinical and Laboratory Haematology 22:211-213.
71. Bain BJ 1985 Platelet count and platelet size in males and females. Scandinavian Journal of Haematology 35:77-79.
72. Morley A 1969 A platelet cycle in normal individuals. Australasian Annals of Medicine 18:127-129.
73. Bain BJ, Seed M 1986 Platelet count and platelet size in Africans and West Indians. Clinical and Laboratory Haematology 8:43-48.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

74. Bessman JD, Williams LJ, Gilmer PR 1982 Platelet size in health and hematologic disease. American Journal of Clinical Pathology 78:150-153.
75. Riley RS, Ben-Ezra JM, Tidwell A, et al 2002 Reticulocyte analysis by flow cytometry and other techniques. Haematology/Oncology Clinics of North America 16:378-420.
76. Sica S, Sora F, Laurenti L, et al 1999 Highly fluorescent reticulocyte count predicts haemopoietic recovery after immunosuppression for severe aplastic anaemia. Clinical and Laboratory Haematology 21:387-389.
77. Davies SV, Cavill I, Bentley N, et al 1992 Evaluation of erythropoiesis after bone marrow transplantation: quantitative reticulocyte counting. British Journal of Haematology 81:12-17.
78. Davis BH, Bigelow N, Ball ED et al 1989 Utility of flow cytometric reticulocyte quantification as a predictor of engraftment in autologous bone marrow transplantation. American Journal of Hematology 32:81-87.
79. Gowans ID, Hepburn MD, Clark DM, et al 1999 The role of the Sysmex SE9000 immature myeloid index and Sysmex R2000 reticulocyte parameters in optimizing the timing of peripheral blood cell harvesting in patients with lymphoma and myeloma. Clinical and Laboratory Haematology 21:331-336.
80. Parisotto R, Gore CJ, Emslie KR et al 2000 A novel method utilizing markers of altered erythropoiesis for the detection on recombinant human erythropoietin abuse in athletes. Haematologica 85:564-572.
81. Torres Gomez A, Casaño J, Sanchez J et al 2003 Utility of reticulocyte maturation parameters in the differential diagnosis of macrocytic anaemias. Clinical and Laboratory Haematology 25:283-288.
82. International Committee for Standardization in Haematology; Expert Panel on Cytometry 1988 The assignment of values to fresh blood used for calibrating automated blood cell counters. Clinical and Laboratory Haematology 10:203-212.
83. Lewis SM, England JM, Rowan RM 1991 Current concerns in haematology 3: Blood count calibration. Journal of Clinical Pathology 44:881-884.
84. International Council for Standardization in Haematology 1994 Reference method for the enumeration of erythrocytes and leucocytes. Clinical and Laboratory Haematology 16:131-138
85. National Committee for Clinical Laboratory Standards 1996 Performance goals for the internal quality control of multichannel hematology analyzers; approved standard. NCCLS, Wayne, PA.
86. British Committee for Standards in Haematology 1991 Assessment of the need for blood film examination with blood counts by aperture-impedance systems. In: Roberts B (ed) Standard Haematology Practice, pp. 34-42 Blackwell Scientific, Oxford.
87. Koepke JA 2002 Instrument flagging and blood film review. In: Rowan RM, van Assendelft OW, Preston FE (eds) Advanced laboratory methods in haematology pp. 64-77. Arnold, London.

4 Métodos de preparación y tinción de las extensiones sanguíneas y de la médula ósea

Barbara J. Bain y S. Mitchell Lewis

Preparación de las extensiones sanguíneas en los portaobjetos 51
Método manual 51
Métodos automatizados 52
Etiquetado de las extensiones sanguíneas 52
Fijación de las extensiones sanguíneas 53
Extensiones de la médula ósea 53
Tinción de las extensiones sanguíneas y de la médula ósea 53
Preparación de soluciones de coloración de Romanowsky 54
Métodos de tinción 55
Tinción de May-Grünwald-Giemsa 55
Tinción normalizada de Romanowsky 55
Tinción automatizada 56
Método de tinción rápida 57
Examen de las extensiones sanguíneas en fresco 57
Hematíes 58
Crioglobulinemia 58
Leucocitos 58
Separación y concentración de las células sanguíneas 58
Realización de una preparación de la capa de leucocitos 58
Utilidad de la capa de leucocitos 59
Separación de las poblaciones celulares específicas 59
Parásitos detectables en los aspirados de sangre, médula ósea o bazo 60
Examen de las extensiones sanguíneas en busca de parásitos 60
Realización de gotas gruesas 60
Tinción de gotas gruesas 60
Tinción de extensiones finas en busca de parásitos 61
Tinción de Leishman 61
Paludismo 61
Microscopia de fluorescencia 61
Método cuantitativo de la capa de leucocitos 61
Leishmaniasis 61
Diagnóstico de la leishmaniasis en el laboratorio de hematología 62
Tripanosomiasis 62
Tripanosomiasis africana 62
Tripanosomiasis americana 64
Diagnóstico de la tripanosomiasis en el laboratorio de hematología 64
Preparaciones en fresco 64
Extensiones sanguíneas (gotas) gruesas o aspirados de los chancros 64
Técnicas de concentración 65
Filariasis y loiasis 65
Diagnóstico de la filariasis en el laboratorio de hematología 65
Preparaciones en fresco 65
Técnicas de concentración 65
Babesiosis 66
Ehrlichiosis 66

PREPARACIÓN DE LAS EXTENSIONES SANGUÍNEAS EN LOS PORTAOBJETOS

Las extensiones sanguíneas deben hacerse en portaobjetos de cristal limpios. Las extensiones hechas en cubreobjetos de cristal poseen ventajas insignificantes y no son adecuadas para las prácticas modernas de laboratorio. Las extensiones deben realizarse a mano o por medio de un extensor automatizado; este último puede ser un instrumento aislado o ser un componente de un contador automatizado de células sanguíneas.

Método manual

Las extensiones sanguíneas pueden prepararse a partir de sangre fresca sin anticoagulante o de sangre anticoagulada con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). En general, no se debe utilizar sangre heparinizada porque sus carac-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

terísticas de tinción difieren de las de la sangre anticoagulada con EDTA. Las extensiones correctas deben realizarse de la siguiente forma: utilizando portaobjetos limpios y, si es necesario, limpiándolos de polvo inmediatamente antes de utilizarlos; los portaobjetos deben medir 75 × 25 mm y tener aproximadamente 1 mm de grosor; lo ideal es que estén esmerilados en un extremo para facilitar el etiquetado, aunque son más caros.

En primer lugar, se confecciona un extensor a partir de un portaobjetos de cristal que tenga un borde suave. Utilizando un cúter para vidrio, romper una esquina del portaobjetos dejando una anchura de cerca de 18 mm para utilizarlo como extensor. El extensor se puede utilizar indefinidamente hasta que el extremo se desportille, pero es preciso lavarlo y secarlo minuciosamente entre extensión y extensión.

Depositar una pequeña gota de sangre en la línea central de un portaobjetos a 1 cm aproximadamente de uno de los extremos. Inmediatamente después, colocar el extensor frente a la gota en un ángulo de 30° con el portaobjetos y deslizarlo hacia atrás hasta que haga contacto con la sangre. La gota debe extenderse rápidamente a lo largo de la línea de contacto. Con un movimiento firme de la mano, extender la gota de sangre a lo largo del portaobjetos. No se debe levantar el extensor hasta que se haya extendido el último trazo de sangre; con una gota de tamaño adecuado, la extensión debería tener unos 3 cm de longitud. Es importante que la extensión de sangre acabe al menos 1 cm antes del final del portaobjetos (fig. 4.1).

El grosor de la extensión se puede regular variando la presión y la velocidad con que se realiza y cambiando el ángulo en el que se aplica el extensor. En la sangre de pacientes anémicos, el grosor correcto se consigue utilizando un ángulo más ancho; al contrario, el ángulo debe ser más agudo en la sangre policitémica. El grosor ideal es aquel en el que se puede ver con el microscopio un cierto solapamiento de los hematíes en la mayor parte de la longitud de la extensión (v. pág. 33). Los leucocitos deben ser fácilmente reconocibles en casi toda la extensión. En las extensiones mal realizadas los leucocitos se distribuyen de forma desigual, de tal manera que los monocitos y otros grandes leucocitos aparecen en el extremo final y en los lados de la extensión. Si el portaobjetos está grasiento obtendremos una extensión con rayas irregulares y el polvo en la superficie originará manchas desiguales (v. fig. 4.1).

Hay que dejar que las extensiones se sequen al aire. En ambientes húmedos se pueden someter las extensiones a una corriente de aire caliente (p. ej., un secador de pelo), pero hay que hacerlo en una campana de seguridad microbiológica.

Métodos automatizados

Hay que seguir las instrucciones del fabricante, a menos que la experiencia propia haya demostrado que con la variación de la técnica recomendada se consiguen mejores resultados.

Etiquetado de las extensiones sanguíneas

La extensión debe etiquetarse inmediatamente después de que se haya extendido. Escribir un número de referencia del laboratorio o el nombre del paciente y la fecha a lápiz en el extremo esmerilado del portaobjetos o en la extensión misma (escribir en la parte más gruesa, que es la menos adecuada para el examen microscópico). La etiqueta escrita a lápiz no se eliminará con la tinción. Posteriormente se debe pegar una etiqueta de papel al portaobjetos.

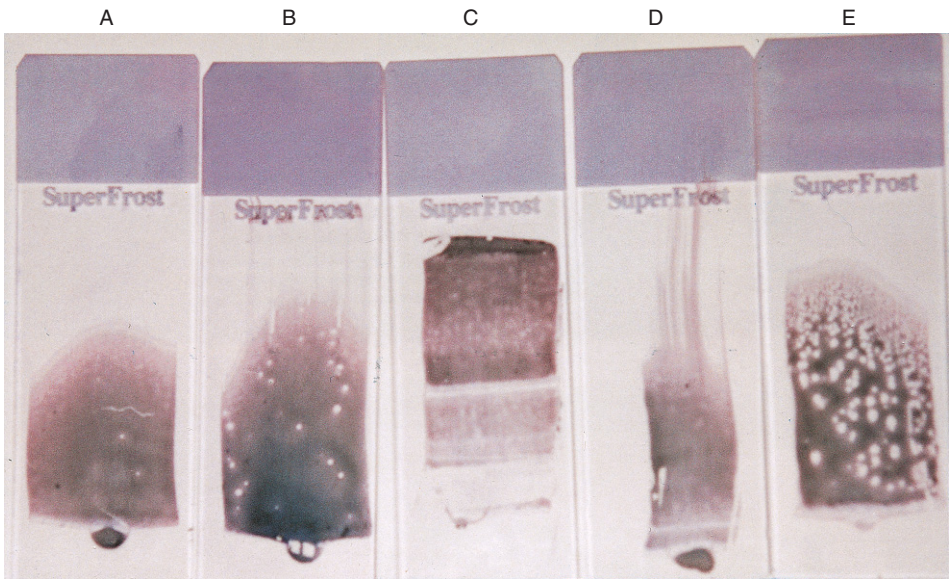


Figura 4.1. Extensiones sanguíneas realizadas en portaobjetos. A: Extensión bien realizada. B: Extensión desigual e irregular en un portaobjetos con polvo. C: Extensión demasiado gruesa. D: Extensión realizada con presión inconstante y utilizando un extensor de bordes irregulares, lo que da como resultado colas largas. E: Extensión realizada en un portaobjetos muy grasiento.

Si hay que conservar las extensiones sanguíneas para referencias futuras, pegar la etiqueta de papel de forma que sea fácilmente legible cuando se archiven los portaobjetos.

En un laboratorio computarizado se prefiere el uso de las etiquetas con código de barras para la identificación de las muestras por sus mayores prestaciones.

Fijación de las extensiones sanguíneas

Para preservar la morfología de las células, hay que fijar las extensiones como se describe en la página 55. Debe hacerse sin demora y no dejar transcurrir nunca más de unas pocas horas sin fijar las extensiones. Si las extensiones se envían al laboratorio por correo, es preferible que, en la medida de lo posible, se sequen y fijen minuciosamente antes de expedirlas.

Extensiones de la médula ósea

El método para preparar las extensiones de la médula ósea se describe en la página 103. Deben hacerse sin demora. Hay que fijar al menos una de las extensiones para colorearla con la tinción de Perls y, si es necesario, fijar las extensiones con los fijadores adecuados para colorantes especiales (v. cap. 13); las demás se pueden fijar y teñir con el colorante de Romanowsky como se describirá más tarde. Las preparaciones de partículas de médula ósea aplastada y de pequeñas cantidades de muestras de biopsia por trepanación pueden colorearse de la misma forma.

TINCIÓN DE LAS EXTENSIONES SANGUÍNEAS Y DE LA MÉDULA ÓSEA

Los colorantes de Romanowsky se utilizan universalmente para la tinción rutinaria de las extensiones sanguíneas, pudiéndose obtener resultados satisfactorios con ellos. La notable propiedad de los colorantes de Romanowsky para producir sutiles diferencias en los matices de la tinción y en la tinción de los gránulos de forma diferente depende de dos componentes: azur B (trimetiltionina) y eosina Y (tetrabromofluoresceína)[1,2].

La combinación original de Romanowsky era azul de metileno polícromo y eosina. Varios de los colorantes basados en el azur B, que se utilizan actualmente de forma rutinaria, incluyen también al azul de metileno, aunque su necesidad es discutible. Algunos creen que su presencia en el colorante potencia la tinción de los nucléolos y de los hematíes policromáticos; en su ausencia los gránulos neutrófilos normales tienden a teñirse fuertemente y pueden parecer «gránulos tóxicos» en las extensiones teñidas de forma convencional[3].

Existen diversas causas que producen variaciones en la tinción. Uno de los factores principales es la presencia de contaminantes en los colorantes comerciales, de forma que es preferible utilizar una combinación sencilla de azur B y eosina Y que los colorantes más complejos, porque así se asegura la estabilidad de los resultados de lote a lote[1,4,5]. Sin embargo, como los tintes totalmente puros son caros, en la práctica se considera suficiente si se garantiza que el contenido en colorante apropiado es, al menos del 80%[6]. Entre los colorantes de Romanowsky actualmente en uso, Jenner es el más sencillo y Giemsa el más complejo. El colorante de Leishman, situado en una posición intermedia, se utiliza aún ampliamente en la tinción rutinaria de las extensiones sanguíneas, aunque los resultados son inferiores a los obtenidos con los métodos combinados de May-Grünwald-Giemsa, Jenner-Giemsa y azur B-eosina Y. La tinción de Wright, ampliamente utilizada en Norteamérica, da unos resultados similares a los obtenidos con la tinción de Leishman, mientras que la tinción de Wright-Giemsa es similar a la de May-Grünwald-Giemsa.

Un pH hacia el lado alcalino de la neutralidad acentúa el componente azur a expensas de la eosina y viceversa. Habitualmente, se recomienda un pH de 6,8 para uso general pero, en cierta medida, esto depende de las preferencias personales. (Para buscar los parásitos del paludismo, se recomienda un pH de 7,2 para ver la granulación de Schüffner.) Para conseguir un pH uniforme, se pueden añadir 50 ml del tampón fosfato de Sörensen, 66 mmol/l (v. pág. 589), a cada litro del agua utilizada para diluir los colorantes y lavar las extensiones.

El mecanismo por el cual ciertos componentes de una estructura celular se tiñen con un colorante particular y otros componentes no lo hacen depende de las complejas diferencias en la unión de los colorantes a las estructuras químicas y de las interacciones entre las moléculas del colorante[7]. El azur B se une a las moléculas aniónicas, mientras que la eosina Y se une a las partes catiónicas de las proteínas.

De esta forma, los agrupamientos acídicos de los ácidos nucleicos y las proteínas de los núcleos celulares y del citoplasma primitivo determinan la captación del colorante básico azur B mientras que, en sentido contrario, la presencia de los agrupamientos básicos en la molécula de la hemoglobina se traduce en su afinidad por los colorantes acídicos y en su tinción por la eosina. Los gránulos en el citoplasma de los leucocitos neutrófilos se tiñen débilmente por los complejos de azur. Los gránulos eosinófilos contienen un derivado de la espermina con un grupo alcalino que se tiñe fuertemente con el componente acídico del colorante, mientras que los gránulos basófilos contienen heparina, que tiene afinidad por el componente básico del colorante. Estos efectos dependen del equilibrio de la molaridad entre los dos colorantes en las reacciones temporales[2]. El ADN se une muy rápido, el ARN más despacio y la hemoglobina todavía más lentamente; de aquí la necesidad de disponer de una proporción correcta entre el azur B y la eosina para evitar la contaminación de los colorantes y para que la tinción se haga en el momento correcto. Se han propuesto unos colorantes y un método de tinción estandarizados, indicados en la página 55.

Las reacciones colorimétricas del efecto Romanowsky se muestran en la tabla 4.1; las causas de la variación en la tinción se exponen en la tabla 4.2.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 4.1. Coloración de las células sanguíneas en respuesta al colorante de Romanowsky

Componente celular	Color
Núcleos	
Cromatina	Púrpura
Nucléolos	Azul claro
Citoplasma	
Eritroblasto	Azul oscuro
Eritrocito	Rosa oscuro
Reticulocito	Gris-azul
Linfocito	Azul
Metamielocito	Rosa
Monocito	Gris-azul
Mielocito	Rosa
Neutrófilo	Rosa/naranja
Promielocito	Azul
Basófilo	Azul
Gránulos	
Promielocito (gránulos primarios)	Rojo o púrpura
Basófilo	Púrpura negro
Eosinófilo	Rojo-naranja
Neutrófilo	Púrpura
Gránulos tóxicos	Azul oscuro
Plaquetas	Púrpura
Otras inclusiones	
Bastón de Auer	Púrpura
Anillo de Cabot	Púrpura
Cuerpo de Howell-Jolly	Púrpura
Cuerpo de Döhle	Azul claro

Preparación de soluciones de coloración de Romanowsky

Tinción de May-Grünwald-Giemsa

Pesar 0,3 g del colorante en polvo y transferirlo a un matraz de Erlenmeyer de 200-250 ml de capacidad. Añadir 100 ml de metanol y calentar la mezcla a 50 °C. Dejar que se enfríe el matraz de Erlenmeyer hasta los 20 °C y agitarlo varias veces a lo largo del día. Después de dejarlo durante 24 h, filtrar la solución. En ese momento está listo para su uso, sin que sea necesario dejarlo «madurar».

Tinción de Jenner

Preparar una solución de 5 g/l en metanol, exactamente de la misma forma que se ha descrito antes para la tinción de May-Grünwald.

Tinción de Giemsa

Pesar 1 g del colorante en polvo y transferirlo a un Erlenmeyer de 200-250 ml de capacidad. Añadir 100 ml de metanol y calentar la mezcla a 50 °C; conservarlo a esta temperatura durante 15 min agitándolo ocasionalmente; después filtrar la solución. En ese momento está listo para su uso, pero mejorará si se deja reposar durante unas cuantas horas.

Tabla 4.2. Factores que originan una tinción defectuosa

Aspecto	Causas
Núcleos demasiado azules	Concentración de eosina demasiado baja
Azul a negro	Preparación incorrecta del depósito Colorante del depósito expuesto a la luz del día brillante Sobreutilización del lote de la solución de colorante Tintes degradados Tiempo de tinción demasiado corto Solución de tinción demasiado ácida Frotis demasiado grueso Tiempo inapropiado en la solución tampón
Demasiado rosa	Proporción incorrecta de azur B-eosina Y Tintes degradados Tampón con un pH demasiado bajo Lavado excesivo en la solución tampón
Tinción pálida	Solución de tinción vieja Solución de tinción demasiado utilizada Preparación incorrecta del depósito Tintes degradados, sobre todo azur A y/o C Temperatura ambiente elevada
Gránulos de neutrófilos sin teñir	Azur B insuficiente
Gránulos de neutrófilos azul oscuro/negro (seudotóxicos)	Exceso de azur B
Otras anomalías de tinción	Diversos tintes contaminantes y sales metálicas
Depósitos del colorante en la extensión	Solución de tinción dejada en un recipiente sin cubrir Solución de tinción no filtrada
Fondo azul	Fijación inadecuada o almacenamiento prolongado antes de la fijación Recogida de sangre utilizando heparina como anticoagulante

Solución de almacenamiento de azur B-eosina Y

La solución de almacenamiento incluye azur B, tetrafluoroborato o tiocianato (índice de color 52010), >80% puro, y eosina Y (índice de color 45380), >80% pura.

Disolver 0,6 g de azur B en 60 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) y 0,2 g de eosina Y en 50 ml de DMSO; precalentar el DMSO a 37 °C antes de añadir los colorantes. Mantenerlo a 37 °C, sacudiéndolo vigorosamente durante 30 s a intervalos de 5 min hasta que ambos colorantes estén completamente disueltos. Añadir la solución de eosina Y a la solución de azur B y agitarlas bien. Esta solución de al-

macenamiento puede permanecer estable durante varios meses si se mantiene a temperatura ambiente en la oscuridad. El DMSO cristaliza por debajo de los 18 °C; si es necesario, se puede volver a disolver antes de utilizarlo.

Tinción de Leishman

Pesar 0,2 g del colorante en polvo y transferirlo a un Erlenmeyer de 200–250 ml de capacidad. Añadir 100 ml de metanol y calentar la mezcla a 50 °C durante 15 min, agitándolo ocasionalmente. Dejar que el matraz se enfríe y filtrarlo. En ese momento está listo para su uso, pero mejorará si se deja reposar.

Agua tamponada

A 50 ml del tampón fosfato de Sörensen, 66 mmol/l, del pH necesario, añadir agua a un pH de 6,8 hasta conseguir 1 litro (v. pág. 589). Un tampón alternativo puede prepararse con las tabletas tampón disponibles comercialmente. Disolviendo las tabletas en agua se obtiene la solución con el pH necesario.

MÉTODOS DE TINCIÓN

Tinción de May-Grünwald-Giemsa

Secar las extensiones al aire y, a continuación, fijarlas sumergiéndolas en una cubeta con metanol durante 5-10 min. En las extensiones de médula ósea, dejar transcurrir un tiempo superior para asegurar el secado exhaustivo y a continuación sumergirlas durante 15-20 min en metanol. Hay que fijar las extensiones tan pronto como se hayan realizado. Si se dejan sin fijar a temperatura ambiente durante varios días, podemos encontrar un fondo de plasma desecado teñido de un color azul pálido que es imposible eliminar sin echar a perder la tinción de las células sanguíneas. Es importante evitar cualquier contacto con agua antes de que se complete la fijación. El alcohol metílico (metanol) es el fijador de elección, aunque también se puede utilizar alcohol etílico («alcohol absoluto»). Para impedir que el alcohol se contamine con el agua absorbida, debe almacenarse en una botella con un tapón que cierre herméticamente y no dejarlo expuesto a la atmósfera, sobre todo en los climas húmedos. No se deben utilizar los alcoholes desnaturalizados porque contienen agua.

Transferir las extensiones fijadas a una cubeta que contenga colorante de May-Grünwald recién diluido con un volumen igual de agua tamponada. Después de dejar secar las extensiones durante 15 min, transferirlas sin lavar a una cubeta que contenga colorante de Giemsa recién diluido con 9 volúmenes de agua tamponada a pH 6,8.

Tras teñirlas durante 10-15 min, transferir los portaobjetos a una cubeta que contenga agua tamponada a pH 6,8, lavarlas rápidamente con tres o cuatro cambios de agua y, por último, dejarlas reposar en agua durante un corto período de tiempo (habitualmente 2-5 min) para que se produzca la diferenciación. Ésta puede controlarse inspeccionando el portaobjetos mojado con el microscopio a baja resolución; con experiencia, la coloración de la extensión a simple vista es, a menudo, un buen indicador. Hay que transferir los portaobjetos de una solución de tinción a la otra sin que se sequen. No es fácil obtener una tinción uniforme en toda la longitud de la extensión, debido a que la intensidad de la tinción se ve afectada por cualquier variación en el grosor de la extensión.

Cuando se ha terminado la diferenciación, colocar los portaobjetos en posición vertical para que se sequen. Este método está diseñado para teñir varias extensiones al mismo tiempo. Las extensiones aisladas pueden teñirse sumergiendo el portaobjetos en una solución que combine la fijación y la tinción (p. ej., el colorante de Leishman, analizado más adelante), pero es importante asegurarse de que el metanol utilizado como fijador no contiene agua en absoluto. El aspecto de las extensiones se puede ver afectado por cantidades tan pequeñas como un 1% de agua, y mayores contenidos de agua originan cambios macroscópicos (fig. 4.2). Los hematíes se ven también afectados por los restos de detergente en los portaobjetos lavados de forma inadecuada (v. fig. 27.5, pág. 582).

Los colorantes diluidos tienen una capacidad de tinción suficiente para teñir correctamente varios lotes de portaobjetos. Hay que prepararlos a diario y probablemente sea mejor teñir las extensiones del día en dos lotes, uno por la mañana y otro por la tarde. No hay necesidad de filtrar los colorantes antes de su uso a menos que presenten algún depósito.

Tinción normalizada de Romanowsky

La tinción normalizada de Romanowsky[2,5] se basa en un método con colorantes puros propuesto por el International Committee for Standardization in Haematology. Tiene la ventaja de que asegura resultados consistentes de lote a lote, de forma que puede utilizarse para verificar las prestaciones de otras tinciones y para los métodos de reconocimiento automatizado de patrones. Su desventaja en un laboratorio de rutina es que requiere la utilización de DMSO, que es un disolvente potencialmente tóxico con un olor desagradable. Además, las extensiones teñidas tienden a decolorarse a los pocos meses, por lo que esta tinción no debe utilizarse para teñir extensiones de médula ósea que deban ser almacenadas para futuras consultas.

Fijador

Mezclar 1 volumen de solución almacenada de azur B-eosina Y con 14 volúmenes de metanol.

Solución de tinción

Inmediatamente antes de utilizarlo, diluir 1 volumen de la solución almacenada (mencionada previamente) con 14 volúmenes de tampón HEPES (N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-ácido etanosulfónico) a pH 6,6 (pág. 589). Esta solución es estable durante unas 8 h[8].

Método

Secar las extensiones al aire. Dejarlas durante 3 min en el fijador. Dejar los portaobjetos en la solución con el colo-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

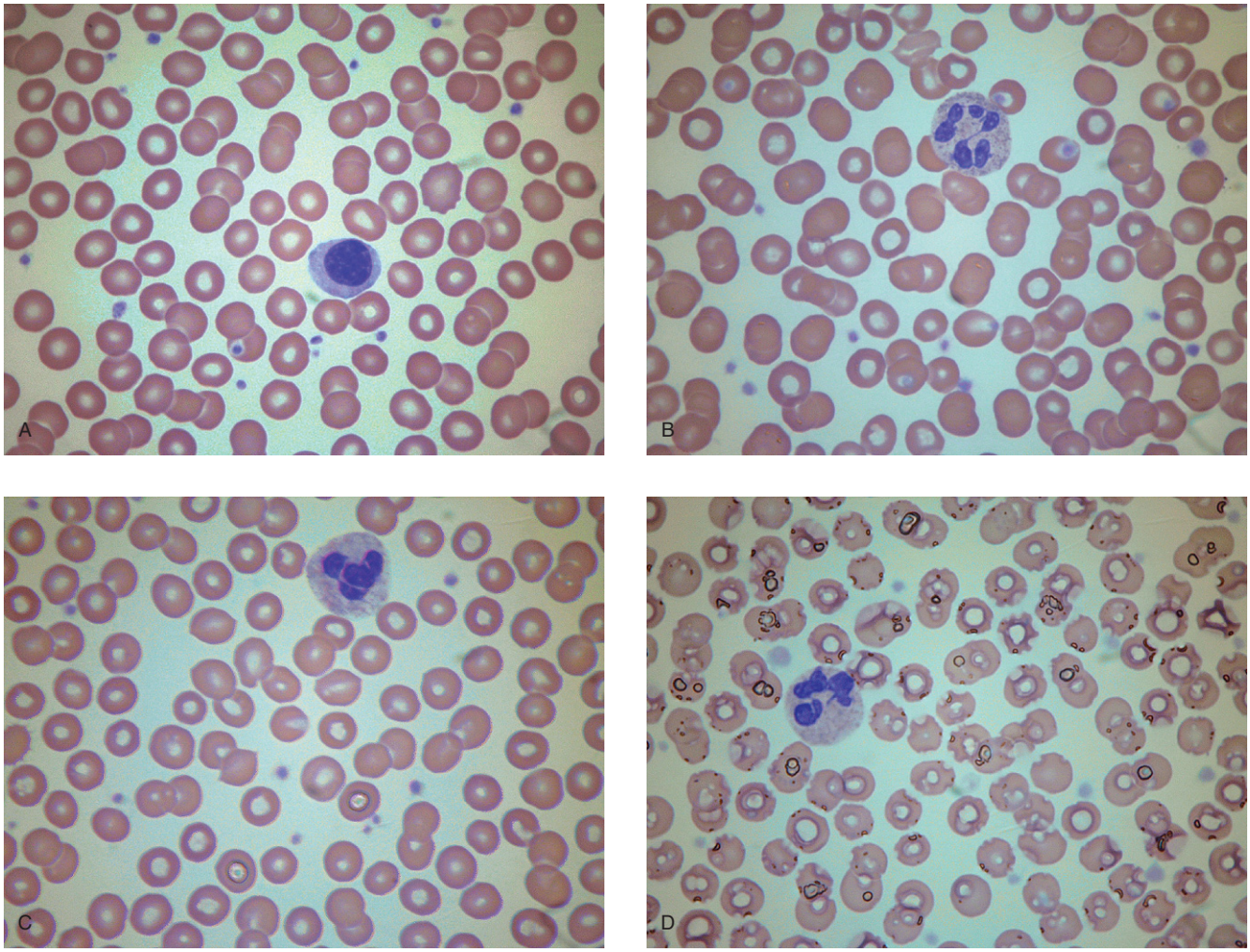


Figura 4.2. Aspectos de las extensiones sanguíneas tras la fijación con metanol. Microfotografías de extensiones sanguíneas teñidas con Romanowsky y fijadas con metanol con distinto porcentaje de agua. A: 1% de agua; B: 3% de agua; C: 4% de agua, y D: 10% de agua. Los hematíes y los leucocitos están bien fijados en A y en B y mal fijados en C y en D.

rante diluido durante 15 min. Aclarar en la solución de tampón fosfato a pH 6,8, durante 1 min. Aclarar después con agua, secar al aire y montar.

Cuando se tiñen diversos lotes de extensiones sucesivamente, se debe renovar la solución de tinción a intervalos (p. ej., después de 50 portaobjetos). La pérdida de la capacidad de tinción se produce habitualmente por la precipitación de la eosina Y, lo que causará la tinción de los núcleos de azul en lugar de púrpura (v. tabla 4.2).

Tinción de Jenner-Giemsa

La tinción de Jenner puede sustituirse por la tinción de May-Grünwald con la técnica descrita en la página anterior. Los resultados son un poco menos satisfactorios. Se utiliza colorante con 4 volúmenes de agua tamponada; las extensiones, tras fijarlas en metanol, se sumergen durante aproximadamente 4 min antes de transferirlas a la tinción de Giemsa. Hay que dejar que se coloreen en esta última solución durante 7-10 min. La diferenciación se lleva a cabo de la forma descrita anteriormente.

Tinción de Leishman

Secar la extensión al aire y sumergir el portaobjetos en el colorante. A los 2 min, añadir el doble del volumen de agua y teñir la extensión durante 5-7 min. Después, lavarla con un chorro de agua tamponada hasta que adquiera un tinte rosado (hasta 2 min). Después de enjugar la parte trasera del portaobjetos, dejarlo en posición vertical para que se seque.

Tinción automatizada

Existen máquinas de tinción automática que permiten manejar grandes lotes de portaobjetos. Pueden ser máquinas de tinción aisladas o formar parte de un equipo más grande para el recuento sanguíneo automatizado. En muchos casos, el equipo extiende, fija y tiñe las extensiones. Algunos equipos automatizados que incorporan la tinción sólo se pueden programar para preparar y teñir una sola extensión por muestra. Otros pueden preparar y teñir múltiples extensiones a partir de una única muestra sanguínea; son

útiles en programas de enseñanza con un gran número de estudiantes. Algunos sistemas aplican las soluciones de tinción a los portaobjetos dispuestos horizontalmente (tinción en lecho horizontal), mientras que otros sumergen el o los portaobjetos en un baño de la solución colorante (técnica de «sumergir y remojar») o pulverizan el colorante sobre los portaobjetos en una citocentrífuga. Los inconvenientes incluyen un aumento de la coloración del fondo, la tinción inadecuada de los gránulos de los neutrófilos, la degranulación de los basófilos y la coloración azul o verde en vez de rosada de los hematíes. Estos inconvenientes están relacionados, por lo general, con los colorantes específicos y los protocolos de tinción utilizados, más que con el tipo de instrumento, aunque los teñidores en lecho horizontal tienen más tendencia a causar problemas con los depósitos del colorante. Sin embargo, como norma, la tinción es satisfactoria siempre que se utilicen colorantes fiables y haya un control cuidadoso de los tiempos del ciclo y de otras variables[9]. Es posible que los teñidores en lecho horizontal no tiñan una extensión completa (p. ej., una extensión de médula ósea) si la misma excede la longitud estándar.

Método de tinción rápida

El método de Field[10,11] se introdujo para proporcionar un método rápido de tinción de extensiones (gotas) gruesas para los parásitos del paludismo (v. más adelante). Con algunas modificaciones, se puede utilizar de forma satisfactoria para la tinción rápida de las extensiones finas. Los colorantes ya preparados están disponibles comercialmente o se pueden preparar de la siguiente forma.

Colorantes

Colorante A (azul de metileno polícromo)

Azul de metileno	1,3 g
Disodio hidrógeno fosfato (Na_2 HPO_4 $12H_2O$)	12,6 g
Potasio dihidrógeno fosfato (KH_2PO_4)	6,25 g
Agua	500 ml

Disolver el azul de metileno y el disodio hidrógeno fosfato en 50 ml de agua. Después, hervir la solución en un baño de agua hasta que casi esté seca para «policromar» el colorante. Añadir el potasio dihidrógeno fosfato y 500 ml de agua recién hervida. Después de agitarlo para disolver el colorante, dejar reposar la solución durante 24 h antes de filtrarla. Filtrar de nuevo antes de utilizarla. El pH es de 6,6-6,8.

Como alternativa, se puede añadir azur B al azul de metileno en proporción de 0,5 g de azur B por 0,8 g de azul de metileno, y disolver directamente la combinación de colorantes en la solución tampón de fosfato.

Colorante B (eosina)

Eosina	1,3 g
Disodio hidrógeno fosfato ($NaHPO_4$ $12H_2O$)	12,6 g
Potasio dihidrógeno fosfato (KH_2PO_4)	6,25 g
Agua	500 ml

Disolver los fosfatos en agua caliente recién hervida y después añadir el colorante. Después de conservarlo durante 24 h, filtrar la solución.

Método

Fijar la extensión durante 10-15 s en metanol. Desechar el metanol y dejar caer en el portaobjetos 12 gotas de la tinción B diluida (1 volumen de colorante en 4 volúmenes de agua). Inmediatamente, añadir 12 gotas de la tinción A. Agitar el portaobjetos para mezclar ambos colorantes. Después de 1 min, aclarar el portaobjetos con agua; después diferenciar la extensión durante 5 s en tampón fosfato a pH 6,6, lavar el portaobjetos con agua y colocarlo en vertical para que escurra y se seque. Los colorantes de este tipo, en dos etapas, están también disponibles comercialmente.

Montaje del cubreobjetos

Cuando esté completamente seca, cubrir la extensión sanguínea con un cubreobjetos rectangular del n.º 1, utilizando para este fin un medio de montaje, que sea miscible con xilol (p. ej., DPX Mountant, Merck). Para los montajes temporales se puede utilizar el aceite de madera de cedro.

El cubreobjetos debe ser lo suficientemente grande para cubrir toda la extensión, de forma que se puedan examinar los bordes y la cola de la misma. Si se utiliza un medio de montaje neutro, se puede conservar la coloración durante muchos años si se mantiene en la oscuridad. Aunque es probable que las extensiones teñidas se conserven mejor sin montar, hay objeciones a esta forma de proceder: es casi imposible conservar los portaobjetos libres de polvo y de arañazos y, cuando no hay un cubreobjetos, el observador siente la tentación de examinar la extensión únicamente con el objetivo de inmersión en aceite, una práctica que debe ser totalmente rechazada porque es importante tener una visión general de la extensión antes de estudiar las células específicas.

EXAMEN DE LAS EXTENSIONES SANGUÍNEAS EN FRESCO

El examen de una gota de sangre sellada entre un portaobjetos y un cubreobjetos tiene, algunas veces, un valor considerable. Se puede examinar la preparación de diferentes formas: con iluminación ordinaria, con campo oscuro o con iluminación de interferencia de Nomarski. Hay que utilizar[a] portaobjetos y cubreobjetos químicamente limpios (v. pág. 592) y dejar que la sangre se extienda entre ellos en una capa delgada. Si las superficies de vidrio no tienen polvo, la sangre se extenderá espontáneamente y no será necesario presionar, lo que por otra parte no es deseable. Los bordes de la preparación pueden sellarse con una mezcla líquida de partes iguales de vaselina y parafina o con esmalte de uñas.

[a] Se comercializan portaobjetos y cubreobjetos ya limpiados.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Hematíes

Formación de cilindros hemáticos

La formación de cilindros hemáticos se observa típicamente en grados variables en las preparaciones en fresco de la sangre completa y debe diferenciarse de la autoaglutinación. La distinción presenta a veces una dificultad considerable, sobre todo cuando, como sucede frecuentemente, la formación de cilindros hemáticos se superpone a la aglutinación. Los cilindros, a su vez, pueden ser marcadamente irregulares en las anemias hemolíticas caracterizadas por esferocitosis, mientras que los cúmulos causados por la formación masiva de cilindros del tipo normal pueden parecerse mucho a una verdadera aglutinación. Esta seudoaglutinación debida a la formación masiva de cilindros puede diferenciarse de la aglutinación real de dos formas:

1. Observando que los hematíes, aunque formen parte de grandes cúmulos, están dispuestos en su mayoría lado a lado como en los cilindros típicos.
2. Añadiendo 3-4 volúmenes de NaCl a 9 g/dl a la preparación. La seudoaglutinación debida a la formación masiva de cilindros se dispersa completamente o se transforma en los cilindros típicos. La adición de solución salina a la sangre que presenta una aglutinación verdadera puede causar que el aglutinado se rompa en cierta medida, pero la mayor parte de él tiende a persistir y no se observarán los cilindros típicos.

En las preparaciones en fresco de sangre se pueden reconocer la *anisocitosis* y la *poiquilocitosis*; sin embargo, la tendencia a la crenación y la formación de cilindros dificultan bastante la observación de los cambios morfológicos. Tales cambios pueden estudiarse mejor en una preparación en fresco tras la fijación. Para ello, se diluye una muestra de sangre recién extraída, heparinizada o anticoagulada con EDTA en 10 volúmenes de tampón fosfato isoosmótico con pH 7,4 (v. pág. 589) y se fija inmediatamente con un volumen igual de 0,3% de glutaraldehído en tampón fosfato isoosmótico con pH 7,4. Tras dejarlo reposar durante 5 min, se añade 1 gota de esta suspensión a 4 gotas de glicerol y se colocan 1 o 2 gotas en un portaobjetos de vidrio que se sella a continuación[12].

La aparición de oquedades *(pitting)* en la superficie se presenta normalmente en menos del 2% de los hematíes; un aumento de más del 4% es una indicación de una disfunción esplénica. Los agujeros se identifican rápidamente con la iluminación de Nomarski o la microscopia electrónica, y presentan el aspecto de pequeñas indentaciones con el aspecto de un cráter en la superficie celular[13].

La *forma de hoz (sickling)* de los hematíes en las preparaciones «en fresco» de la sangre se describe en el capítulo 12.

Los cristales de la Hb C pueden ponerse de manifiesto incubando una muestra de sangre con un volumen igual de cloruro de sodio a 30 g/l durante 4 h a 37 °C. En la sangre con la enfermedad de la Hb C, este procedimiento induce la formación de cristales intracelulares de Hb C, que son depósitos grandes y claros de material amorfo que se observan bien cuando la preparación se tiñe con cualquiera de los colorantes de Romanowsky[14]. También pueden ponerse de manifiesto en los hematíes con Hb SC.

Crioglobulinemia

Para identificar la crioglobulinemia, se coloca una gota de sangre de una muestra con EDTA que se haya mantenido a temperatura ambiente sobre un portaobjetos de cristal, se tapa con un cubre de vidrio y se examina con el microscopio de contraste de fases. La crioglobulina se verá como un material amorfo claro y grande o como precipitados refringentes que desaparecen cuando el portaobjetos se calienta a 37 °C

Esta prueba es de utilidad cuando el recuento sanguíneo automatizado da resultados anómalos con recuentos de leucocitos y de plaquetas falsamente elevados[15].

Leucocitos

La motilidad de los leucocitos se puede estudiar fácilmente en la sangre heparinizada calentando la platina del microscopio hasta los 37 °C aproximadamente. Por lo general, sólo los granulocitos muestran movimientos progresivos de importancia. Sin embargo, el examen de los neutrófilos vivos en el plasma no tiene utilidad en la práctica hematológica rutinaria diaria. Las técnicas de microscopia especializada aplicables a los leucocitos se analizan en la octava edición de este libro.

SEPARACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS

Disponemos de diversos métodos para determinar la concentración de los leucocitos o de las células anómalas cuando se hallan presentes únicamente en pequeñas cantidades en la sangre periférica. Los concentrados se preparan más fácilmente a partir de la capa de leucocitos de la sangre centrifugada. Sin embargo, la mayoría de los métodos afectan en cierta medida a las propiedades posteriores de tinción, a las reacciones químicas y a la viabilidad de las células separadas.

Realización de una preparación de la capa de leucocitos

Centrifugar una muestra sanguínea con EDTA en un tubo de plástico durante 5-10 min a 1.200-1.500 g. Eliminar después cuidadosamente el plasma sobrenadante con una pipeta fina de plástico y con la misma pipeta depositar las capas de plaquetas y de leucocitos subyacentes en uno o dos portaobjetos. Mezclar la capa de leucocitos con una gota del plasma del paciente y realizar después las extensiones. Dejar que se sequen al aire y a continuación fijarlas y teñirlas de la forma habitual.

Cuando hay pocos leucocitos o hay que preparar muchos portaobjetos, es preferible centrifugar la sangre dos veces;

primero, se centrifugan unos 5 ml y después se llena un segundo tubo con las capas celulares superiores de esta muestra.

Como alternativa al centrifugado, se puede dejar que la sangre sedimente colocando el tubo vertical en la gradilla sin moverlo, con o sin la ayuda de agentes potenciadores de la sedimentación como el fibrinógeno, el dextrano, la goma de acacia, el Ficoll (Pharmacia) o la metilcelulosa[16]. El reactivo de Bøyum[17] (metilcelulosa y metrizoato de sodio) es muy adecuado para obtener preparados de leucocitos con una contaminación mínima de hematíes.

Utilidad de la capa de leucocitos

Es bien conocido que las células primitivas o atípicas circulan en pequeñas cantidades en la sangre periférica del sujeto sano. Así, se pueden encontrar células mononucleares atípicas, metamielocitos y megacariocitos. Incluso se pueden observar, de forma ocasional, promielocitos, blastos y hematíes nucleados, aunque sólo en cantidades muy pequeñas. Efrati y Rozenszajn[18] describieron un método para la valoración cuantitativa de la cantidad de células atípicas encontradas en la sangre normal y dieron cifras para la incidencia de los fragmentos de megacariocitos (p. ej., 21,8 de media por 1 ml de sangre) y de los mononucleares atípicos, los metamielocitos y los mielocitos. En la sangre del cordón umbilical, la incidencia de todos los tipos de células primitivas es considerablemente mayor[19].

En caso de enfermedad, se pueden observar células anómalas en las preparaciones de la capa de leucocitos en cantidades mucho mayores que en las extensiones de sangre completa (fig. 4.3). Otro caso, por ejemplo, son los megacariocitos y las células inmaduras de la serie granulocítica encontrados en, relativamente, grandes cantidades en el carcinoma diseminado[20]. Los megaloblastos, si los hay, pueden ayudar en el diagnóstico de una anemia megaloblástica. La hemofagocitosis, que se observa más a menudo en la médula ósea, puede a veces ponerse de manifiesto en las preparaciones de la capa de leucocitos[21]. La eritrofagocitosis puede ser claramente visible en la anemia hemolítica autoinmunitaria (fig. 4.4). En el lupus eritematoso sistémico (LES) se pueden encontrar algunas células LE, pero no es la mejor forma de ponerlas de manifiesto; por otra parte, la detección de las células LE para el diagnóstico del LES ha sido sustituida por las pruebas inmunológicas para la detección de los anticuerpos antinucleares o anti-ADN.

Las extensiones de la capa de leucocitos pueden ser útiles para la detección de bacterias, hongos o parásitos en los neutrófilos, los monocitos o los macrófagos circulantes; también pueden ayudar a encontrar sideroblastos en anillo en los síndromes mielodisplásicos u otras células que puedan hallarse presentes en cantidades muy pequeñas (p. ej., tricoleucocitos en la leucemia de células peludas). Desde que disponemos de los anticuerpos monoclonales, que reaccionan con células epiteliales u otras células tumorales, se pueden utilizar las técnicas inmunocitoquímicas para la identificación de las células neoplásicas poco frecuentes.

Separación de las poblaciones celulares específicas

Actualmente es posible identificar poblaciones de células específicas por inmunofenotipado por citometría de flujo y se ha reducido la necesidad de separar las células mononucleares de la sangre. No obstante, también puede aprovecharse la diferencia en la densidad de las células para separar los tipos celulares individuales, utilizando soluciones gradiente con un peso específico seleccionado[17,33]. Este método tiene también aplicación en las técnicas de imagen de leucocitos con neutrófilos marcados con radioisótopos (v. pág. 297). Se ha descrito una técnica sencilla y adecuada para disponer en capas la sangre o la médula ósea sobre las

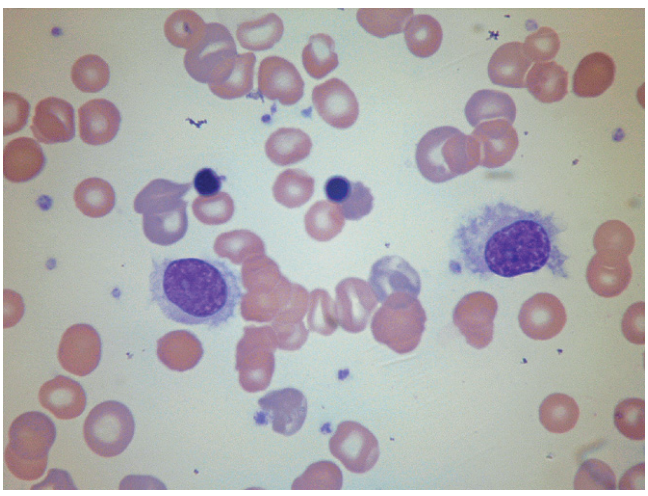


Figura 4.3. Extensión de la capa de leucocitos. A partir de la sangre de un paciente con pancitopenia, se observan dos células peludas, un eritroblasto y un núcleo al descubierto. En la extensión convencional sólo se observaron unas pocas células que parecían células peludas, mientras que en la extensión de la capa de leucocitos había muchas de estas células.

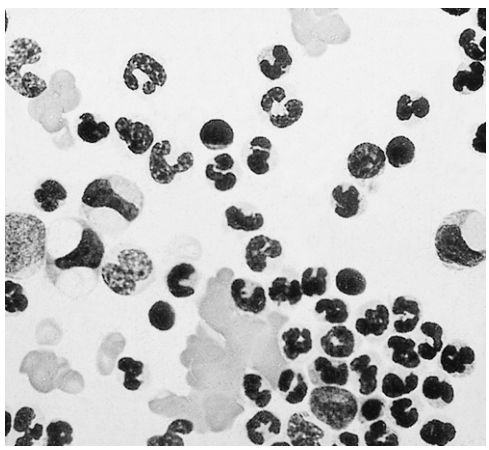


Figura 4.4. Extensión de una capa de leucocitos. Eritrofagocitosis en la anemia hemolítica autoinmune.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

preparaciones según su densidad[22]. Los valores medianos de densidad de las principales células hemopoyéticas son:

Hematíes	1.100
Eosinófilos	1.090
Neutrófilos	1.085
Mielocitos	1.075
Linfocitos	1.070
Monocitos	1.064
Mieloblastos	1.062
Plaquetas	1.035

PARÁSITOS DETECTABLES EN LOS ASPIRADOS DE SANGRE, MÉDULA ÓSEA O BAZO

Actualmente existen diversas pruebas de detección para el diagnóstico del paludismo basadas en la identificación de los antígenos del paludismo (v. cap. 22). Sin embargo, el método esencial para el diagnóstico definitivo sigue siendo el hallazgo de los parásitos en una extensión sanguínea y la identificación de la especie por morfología[23,24]. En este capítulo sólo daremos breves reseñas de los diagnósticos microscópicos. Para mayores detalles, remitimos a los lectores a un libro de texto de parasitología. Además de los *Plasmodia* que originan el paludismo, los otros parásitos importantes que pueden encontrarse en la sangre son: *leishmaniae*, *Babesiae*, tripanosomas, microfilarias y *ehrlichia*.

Aparte de las extensiones finas estándar, cuando existen pocos parásitos son extremadamente útiles las extensiones o gotas gruesas, que deben prepararse y examinarse de forma rutinaria, aunque la identificación de la especie sea menos sencilla que en las extensiones finas y se puedan pasar por alto infecciones compuestas. Cinco minutos consumidos en examinar una extensión gruesa son el equivalente a cerca de 1 h empleada en el examen de una extensión delgada. Una vez confirmada la presencia de los parásitos, hay que utilizar una extensión delgada para determinar la especie y, en caso de *Plasmodium falciparum*, para valorar la gravedad de la infección mediante el recuento del porcentaje de células positivas.

Los niveles bajos de parasitemia que se detectan con las pruebas inmunológicas pueden pasarse por alto con la microscopia y los estudios sobre los ensayos de aptitud han demostrado la necesidad de que todos los laboratorios, sobre todo aquellos con insuficientes conocimientos técnicos, tomen parte en programas de control de calidad externos y refieran los casos problemáticos a los centros con mayor experiencia[25,26].

Las extensiones sanguíneas gruesas son también útiles para la detección de las microfilarias. Cuando se emplean con este fin, es importante examinar la extensión completa utilizando un objetivo de baja resolución; de otra forma, se pueden pasar por alto los parásitos. El examen de las preparaciones sanguíneas en fresco puede utilizarse para el diagnóstico de las microfilarias, ya que tiene la ventaja de que los parásitos se detectan fácilmente porque están en movimiento. Para confirmar la especie se necesita una extensión teñida. Las preparaciones en fresco son también útiles para la detección de los tripanosomas y de las espiroquetas de la fiebre recurrente. La presencia de pequeñas cantidades de tripanosomas o de espiroquetas se revela por la ligera agitación ocasional de los grupos de hematíes. Su naturaleza se confirma mediante el examen de una extensión teñida.

EXAMEN DE LAS EXTENSIONES SANGUÍNEAS EN BUSCA DE PARÁSITOS

Realización de extensiones (gotas) gruesas

La gota gruesa se realiza colocando una pequeña gota de sangre en el centro de un portaobjetos y extendiéndola, con la esquina de otro portaobjetos, hasta cubrir un área que sea aproximadamente cuatro veces el área original. Habremos conseguido el grosor correcto para que la extensión sea satisfactoria si, al colocar el portaobjetos sobre un trozo de papel de periódico, apenas se ve la letra pequeña.

Dejar que la extensión se seque a 37 °C durante al menos 30 min. Si es necesario acelerar el proceso, se puede dejar el portaobjetos próximo a una bombilla donde la temperatura sea de 50-60 °C, pero sin tocarla, durante unos 7 min; la calidad de la extensión puede deteriorarse si se calienta en exceso. Las extensiones muy recientes, aunque estén aparentemente secas, pueden lavarse en parte con la coloración.

Tinción de gotas gruesas

El método de coloración de Field[10,11] es rápido y habitualmente satisfactorio para las extensiones gruesas, pero no es práctico para teñir extensiones en gran cantidad; para este fin son más adecuados los métodos de Giemsa, Leishman o azur B-eosina Y. Es muy importante vigilar cuidadosamente el pH para que los parásitos se tiñan satisfactoriamente.

Tinción de Field

La preparación de los colorantes se describe en la página 57.

1. Sumergir el portaobjetos con la extensión seca en el colorante A durante 3 s.
2. Sumergir en una vasija con agua del grifo durante 3 s agitándolo suavemente.
3. Sumergir en el colorante B durante 3 s.
4. Lavar suavemente en el agua del grifo durante unos cuantos segundos hasta que se elimine todo el colorante en exceso.
5. Dejar escurrir el portaobjetos verticalmente hasta que se seque. No secarlo por adsorción.

Tinción de Giemsa

1. Secar las extensiones minuciosamente, como se ha explicado antes.

2. Sumergir los portaobjetos durante 20-30 min en una cubeta de tinción que contenga el colorante de Giemsa recién diluido en 20 volúmenes de agua tamponada (pH 7,2).
3. Lavar en agua tamponada a pH 7,2 durante 3 min.
4. Colocar los portaobjetos verticalmente para que se sequen. No secarlos por adsorción.

Tinción con azur B-eosina Y

1. Preparar una solución de tinción del depósito de colorantes, según se describe en la página 54, pero utilizando el tampón HEPES a pH 7,2.
2. Después de que se sequen las extensiones y se traten como se ha descrito antes, teñirlas durante 10 min en la solución de tinción.
3. Aclarar durante 1 min en agua tamponada a pH 7,2.
4. Colocar los portaobjetos en vertical para que se sequen. No secarlos por adsorción.

Algunas veces, al teñir las extensiones gruesas, éstas quedan recubiertas por una capa de residuos del colorante o se echan a perder con las membranas de los hematíes lisados. Estas anomalías pueden minimizarse añadiendo Tritón X-100 al 0,1% al tampón antes de diluir el colorante del depósito[27]. Un método alternativo, aunque más laborioso, es lisar 1 volumen de sangre con 3 volúmenes de saponina al 1% en suero salino durante 10 min, centrifugar a continuación durante 5 min, decantar el sobrenadante y realizar las extensiones a partir del sedimento residual[28].

TINCIÓN DE EXTENSIONES FINAS EN BUSCA DE PARÁSITOS

Hay que teñir las extensiones finas con el colorante de Giemsa o el de Leishman a pH 7,2, pero no con el colorante estándar de May-Grünwald-Giemsa.

Tinción de Leishman

Utilizar el colorante disponible comercialmente o prepararlo de la siguiente forma:

1. Añadir cuentas de cristal a 500 ml de metanol.
2. Añadir 1,5 g de polvo de Leishman.
3. Agitar bien, dejarlo en un agitador rotatorio durante el día y, después, incubar a 37 °C durante la noche.

No hay necesidad de filtrarlo.

Método

1. Realizar una extensión delgada y secarla al aire rápidamente.
2. Colocar la extensión en una gradilla de tinción, anegarla con el colorante de Leishman y dejar que se fije durante de 30 s a 1 min.
3. Añadir el doble de agua destilada tamponada (preferentemente de una botella de plástico de lavado porque permite una mejor mezcla de la solución) a pH 7,2.
4. Dejar teñir durante 10 min.
5. Eliminar el colorante con agua del grifo.

Las extensiones sanguíneas gruesas también son útiles para la detección de las microfilarias. Cuando se utilizan para este fin, es importante examinar la extensión completa utilizando un objetivo de baja resolución; de otra forma se pueden pasar por alto los parásitos. El examen de la sangre en fresco (v. más adelante) puede también utilizarse para la identificación de las microfilarias y tiene la ventaja de que, como los parásitos están en movimiento, son fácilmente detectables. Para la confirmación de la especie se necesita examinar una extensión teñida.

PALUDISMO

Los métodos para teñir y examinar las extensiones sanguíneas delgadas y gruesas para detectar el *Plasmodium* se han descrito anteriormente. Las extensiones para el paludismo deben realizarse antes de 3 o 4 h tras la recogida de la sangre. Los criterios morfológicos para la diferenciación de los parásitos del paludismo se exponen en la tabla 4.3 y se ilustran en la figura 4.5. Hay disponibles otros dos métodos de detección basados en su morfología.

Microscopia de fluorescencia

Los hematíes que contienen parásitos del paludismo emiten fluorescencia cuando se examinan con el microscopio de fluorescencia después de teñirlos con naranja de acridina[29,30]. La sensibilidad de este examen es de cerca del 90% en las infecciones agudas, pero se reduce al 50% con niveles inferiores de parasitemia y puede haber lecturas positivas falsas con los cuerpos de Howell–Jolly y con los reticulocitos[23]. En caso de positividad, es necesario examinar una extensión sanguínea teñida de forma convencional para identificar la especie.

Método cuantitativo de la capa de leucocitos

El método cuantitativo de la capa de leucocitos (QBC, del inglés *quantitative buffy coat*) (BD Diagnostic Systems) es otro procedimiento para la detección de parásitos por microscopia de fluorescencia. La sangre se centrifuga en tubos capilares revestidos con naranja de acridina. Es altamente sensible pero requiere un equipo caro y tiene la desventaja de producir falsos positivos en presencia de cuerpos de Howell-Jolly y de reticulocitos. En caso de positividad, se requiere el examen de una extensión sanguínea teñida para identificar la especie, pero resulta útil como prueba de detección inicial[23,31].

LEISHMANIASIS

La especie *Leishmania* se transmite por la picadura de la mosca de la arena hembra infectada y está asociada con

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 4.3. Diferenciación morfológica de los parásitos del paludismo

	P. falciparum	*P. vivax*	*P. ovale*	*P. malariae*
Hematíes infectados	Tamaño normal[a]; Manchas de Maurer[b]	Agrandados; puntos de Schüffner[c]	Agrandados; ovales y con fimbrias; puntos de Schüffner[c]	Normales o microcíticos; habitualmente no se ve el punteado
Formas anulares (trofozoítos iniciales)	Delicados; frecuentemente 2 o más; formas reunidas[d]; punto de cromatina pequeño	Grandes, gruesos; habitualmente únicos (en ocasiones 2) en la célula; punto de cromatina grande	Anillos compactos y gruesos	Anillos compactos muy pequeños
Trofozoítos tardíos	Compactos, vacuolados; a veces 2 puntos de cromatina	Ameboide, vacuola central; citoplasma azul claro	Más pequeño que *P. vivax*; ligeramente ameboide	Banda a través de la célula; citoplasma azul oscuro
Esquizontes	18-24 merozoítos ocupando $^2/_3$ de la célula	12–24 merozoítos dispuestos de forma irregular	8–12 merozoítos ocupando $^3/_4$ de la célula	6-12 merozoítos dispuestos en forma de margarita alrededor de una masa central de pigmento
Pigmento	Masa aglomerada oscura a negra	Granular fino; amarillo-marrón	Marrón claro tosco	Oscuro, prominente en todas las fases
Gametocitos	Medialuna en forma de salchicha; cromatina difusa; núcleo único	Esféricos, compactos, rellenando casi la célula; núcleo único	Oval; rellena $^3/_4$ de la célula; similar a *P. vivax*, aunque más pequeño	Redondo; rellena la $^1/_2$ a los $^2/_3$ de la célula; similar a *P. vivax*, pero más pequeño, sin puntos de Schüffner

[a]En *P. falciparum* es importante notificar el porcentaje de hematíes infectados.
[b]Puntos que se tiñen de rojo, grandes y con morfología irregular.
[c]Punteado fino.
[d]Es decir, marginados en el extremo de la célula («aplicados»).

diversos trastornos clínicos entre los que se encuentran la leishmaniasis visceral, mucosa y cutánea. La leishmaniasis visceral puede aparecer ante el hematólogo en forma de esplenomegalia, hepatomegalia, fiebre, linfadenopatía o pancitopenia, y su presencia se notifica, cada vez más a menudo, en pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Cuando se sospecha leishmaniasis, las pruebas diagnósticas iniciales recomendadas son los estudios serológicos. En las etapas avanzadas de la enfermedad, se pueden encontrar los parásitos en las células fagocitarias de bazo, nódulos linfáticos, médula ósea y sangre periférica. Sin embargo, el cultivo del aspirado de la médula ósea es una técnica diagnóstica más sensible que la microscopia.

Diagnóstico de la leishmaniasis en el laboratorio de hematología

La leishmaniasis se diagnostica en el laboratorio de hematología por visualización directa de los amastigotes (a menudo denominados cuerpos de Leishman-Donovan). Las preparaciones de la capa de leucocitos de la sangre periférica o de los aspirados (v. pág. 58 para la preparación de la capa de leucocitos) de la médula ósea, el bazo, los ganglios linfáticos o las lesiones cutáneas deben extenderse en un portaobjetos para realizar un frotis fino y teñirlo después con el colorante de Leishman o de Giemsa (pH 7,2) durante 20 min (v. pág. 53). Los amastigotes se ven en los monocitos o, menos habitualmente, en los neutrófilos en sangre periférica y en los macrófagos en los aspirados de médula ósea. Son cuerpos pequeños, redondos, de 2-4 mm de diámetro con un citoplasma indiferenciado, un núcleo y un cinetoplasto pequeño y en forma de barra (fig. 4.6A). En ocasiones, se pueden observar los amastigotes de forma libre entre las células.

TRIPANOSOMIASIS

Tripanosomiasis africana

La tripanosomiasis africana (enfermedad del sueño) está producida por el *Trypanosoma brucei gambiense* (África occidental y el oeste del África central) y el *Trypanosoma brucei rhodesiense* (África oriental, central y del sur), y se transmite por un número pequeño de especies de la mosca tse-tsé. Los tripomastigotes pueden encontrarse en la sangre, en los aspirados de los ganglios linfáticos y en el líquido cefalorraquídeo, pero, para su detección, es posible que se necesite la repetición de los exámenes y el uso de

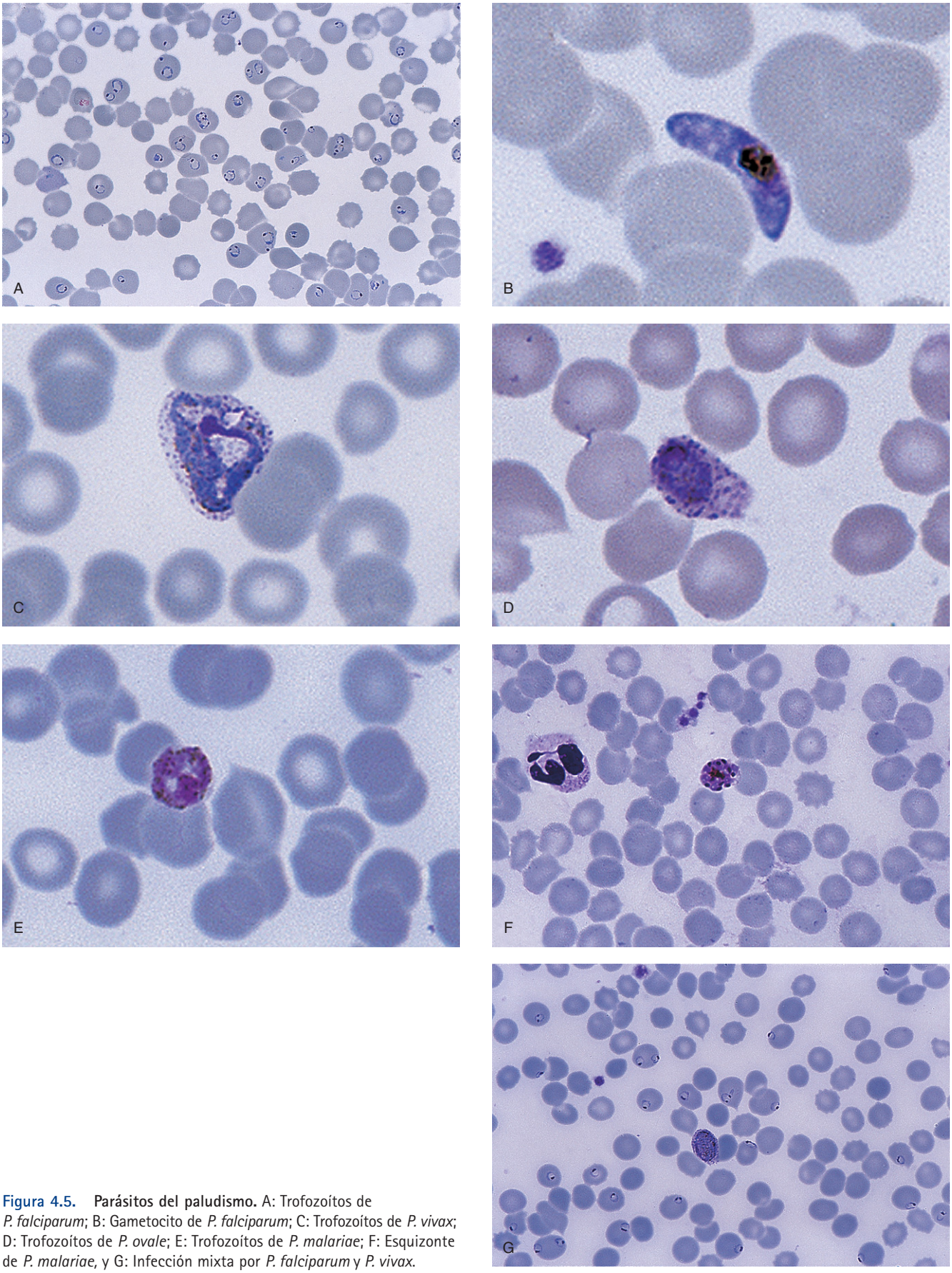


Figura 4.5. Parásitos del paludismo. A: Trofozoítos de *P. falciparum*; B: Gametocito de *P. falciparum*; C: Trofozoítos de *P. vivax*; D: Trofozoítos de *P. ovale*; E: Trofozoítos de *P. malariae*; F: Esquizonte de *P. malariae*, y G: Infección mixta por *P. falciparum* y *P. vivax*.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

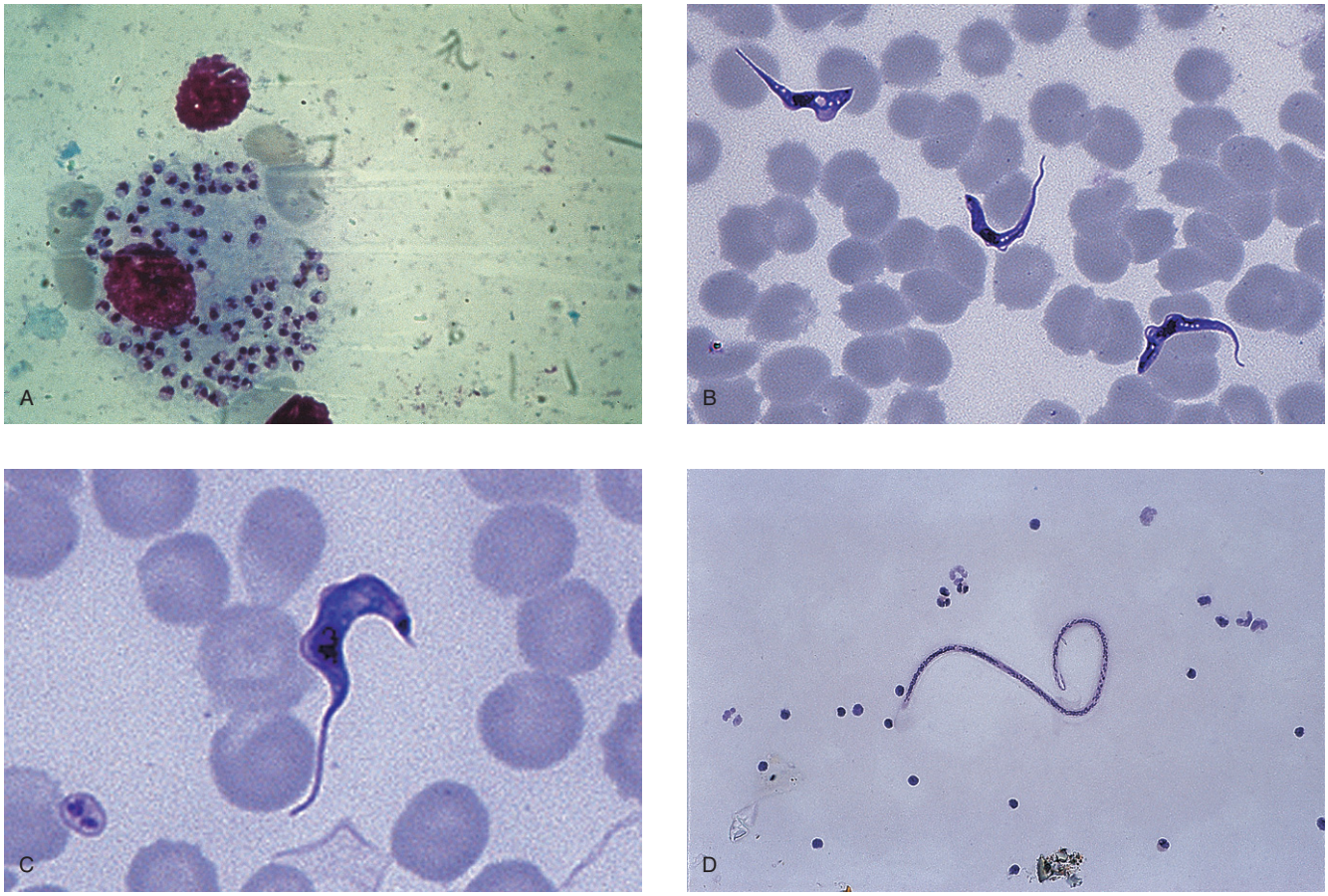


Figura 4.6. Parásitos sanguíneos. A: Leishmaniasis (cuerpos de Leishman-Donovan); B: Tripanosomiasis africana; C: Tripanosomiasis *(T. cruzi)*, y D: Microfilaria.

técnicas de concentración. Las investigaciones serológicas pueden ser también de utilidad en el diagnóstico.

Tripanosomiasis americana

La tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas) está producida por el *Trypanosoma cruzi*, que es transmitido por el chinche *Reduviidae,* subfamilia *Triatominae*. La enfermedad de Chagas se encuentra únicamente en los países tropicales y subtropicales de América Central y de Sudamérica. Los tripomastigotes sólo pueden encontrarse circulando en la sangre en la forma aguda de la enfermedad de Chagas. Ya que los tripomastigotes son más frágiles que los que causan la tripanosomiasis africana, se recomienda la serología en lugar de la morfología para detectarlos inicialmente. En el laboratorio de hematología, las pruebas que detectan los organismos móviles son más sensibles que las que necesitan preparaciones fijadas y teñidas.

Diagnóstico de la tripanosomiasis en el laboratorio de hematología

Hay que tener cuidado al manejar las muestras sospechosas de infección con tripomastigotes porque se puede producir una infección si los organismos penetran en la piel. Existen diversas técnicas para examinar las muestras en busca de tripomastigotes.

Preparaciones en fresco

Los tripomastigotes, si están presentes en concentraciones elevadas, pueden observarse entre las células de una preparación fresca, húmeda y no teñida de sangre o de líquido de los ganglios linfáticos. Hay que examinar las preparaciones en las 4 h siguientes a la toma de la muestra (este tiempo puede prolongarse si se añaden unos cuantos miligramos de glucosa a la muestra) utilizando un objetivo ×40 y un microscopio con un diafragma condensador parcialmente cerrado o de campo oscuro o de contraste de fases.

Extensiones sanguíneas (gotas) gruesas o aspirados de los chancros

El examen de una gota gruesa permite el examen rápido de la mayor parte de la muestra, aunque los *T. cruzi* resultan fácilmente dañados al extender las muestras para realizar gotas gruesas. Las gotas gruesas se preparan extendiendo una gota de sangre en un portaobjetos hasta cubrir un área de 15-20 mm de diámetro y tiñéndolas después con la téc-

nica de tinción de Giemsa o la técnica rápida de Field (v. pág. 57) como en los frotis del paludismo. Microscópicamente, no se puede distinguir al *T. b. gambiense* del *T. b. rhodesiense*; ambos tienen de 13 a 42 mm de longitud, un único flagelo, un núcleo dispuesto centralmente y un cinetoplasto pequeño y puntiforme. *T. cruzi* mide de 12 a 30 mm y tiene un cinetoplasto mayor que *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense* (fig. 4.6B y C).

Técnicas de concentración

Método cuantitativo de la capa de leucocitos

Hacemos referencia al método QBC[31,32] en la página 61. Tras la centrifugación, hay que dejar el tubo en vertical durante 5 min y examinar después el plasma del área de interfaz en busca de tripomastigotes móviles. Esta prueba se ha postulado como el «patrón oro» para el diagnóstico.

Método del tubo capilar

Llenar uno o dos tubos capilares de microhematocrito con EDTA o con sangre con citrato. Sellar los extremos y centrifugar durante 5 min como para un microhematocrito. Después colocar los tubos capilares adyacentes entre sí sobre un portaobjetos de microscopio y fijar ambos extremos sobre el portaobjetos con cinta adhesiva (fig. 4.7). Examinar inmediatamente el plasma subyacente a la capa de hematíes y de leucocitos en busca de tripomastigotes móviles utilizando un objetivo ×20 o ×10 con el diafragma condensador parcialmente cerrado o con microscopia de campo oscuro.

FILARIASIS Y LOIASIS

La filariasis que afecta a los ganglios linfáticos es la causa de la elefantiasis. Está originada por los gusanos de la filaria *Brugia malayi, Wuchereria bancrofti* y *Brugia timori*, mientras que la infección filariana del tejido subcutáneo es producida por *Loa loa*. Los mosquitos transmiten las larvas de estos gusanos, las microfilarias, a los humanos, en cuya sangre se pueden hallar y en donde muestran una cierta periodicidad con niveles fluctuantes en diferentes momentos del día (fig. 4.6D).

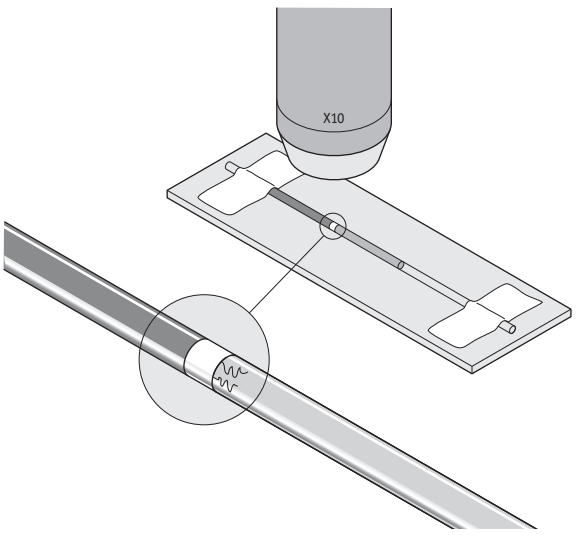


Figura 4.7. Método de concentración en el tubo capilar. Método utilizado para detectar tripomastigotes o microfilarias en sangre. Véase el texto.

Diagnóstico de la filariasis en el laboratorio de hematología

Las concentraciones sanguíneas de microfilarias son, a menudo, mayores en la sangre capilar que en la sangre venosa. Sin embargo, incluso si la sangre se ha extraído en el momento adecuado, las microfilarias pueden ser escasas, por lo que se requieren técnicas de concentración y pruebas serológicas e inmunocromatográficas rápidas.

Preparaciones en fresco

A partir de 20 µl de sangre se prepara una extensión sanguínea gruesa y se tiñe como los frotis del paludismo (v. pág. 61).

Técnicas de concentración

Método de filtración

El método de filtración es el método de concentración más sensible para las microfilarias, pero hay que manejar las muestras muy suavemente para preservar los organismos. Pasar sangre anticoagulada (10 ml), seguida de 10 ml de una solución salina de azul de metileno o de azur B, a través de un filtro de membrana de policarbonato transparente de 3 mm de porosidad unido a una jeringa. El filtro se sitúa boca arriba sobre un portaobjetos, se añade una gota de solución salina y se coloca un cubreobjetos sobre él. Se examina microscópicamente toda la membrana en busca de microfilarias móviles utilizando un objetivo ×10 y un diafragma condensador parcialmente cerrado o un microscopio de campo oscuro.

Métodos cuantitativos de la capa de leucocitos y del microhematocrito

Las microfilarias pueden detectarse con los mismos métodos que se utilizan para la detección de los tripomastigotes (v. anteriormente).

Sangre capilar lisada

Mezclar sangre (1 ml) con 9 ml de formalina al 2% y centrifugar a 1.000 g durante 5 min. Colocar todo el sedimento en un portaobjetos y añadir una gota del colorante A de Field o de azul de metileno al 1% para facilitar la identificación de la especie. Las microfilarias móviles pueden verse utilizando un objetivo ×10 con un diafragma condensador parcialmente cerrado o con microscopia de campo oscuro.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

BABESIOSIS

La babesiosis está causada por *Babesia*, un protozoo intraeritrocitario transmitido por la garrapata. Los humanos se infectan por casualidad durante el ciclo natural de transmisión entre la garrapata y su huésped animal, doméstico o salvaje. Tiene una especial prevalencia en los países tropicales y subtropicales. La infección produce una fiebre alta acompañada de ictericia y de una anemia hemolítica grave con hemoglobinuria; hay leucocitosis con neutrofilia.

Los parásitos pueden observarse en los hematíes en las extensiones sanguíneas teñidas con Giemsa. Morfológicamente son corpúsculos variables de forma oval o redondeada que pueden ser confundidos con la forma anular del *Plasmodium*, pero que se diferencian de ellos por la presencia de células divididas de forma característica, consistentes en dos células hijas unidas por una hebra delgada de citoplasma; por otra parte, no se produce pigmentación en los hematíes infectados con *Babesia* en sus estadios finales.

EHRLICHIOSIS

La ehrlichiosis es una fiebre transmitida por garrapatas en la que se pueden observar grupos de pequeños organismos en las extensiones sanguíneas teñidas con Giemsa. La detección de los organismos en el interior de los neutrófilos o de los monocitos es importante para el diagnóstico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wittekind D 1979 On the nature of Romanowsky dyes and the Romanowsky Giemsa effect. Clinical and Laboratory Haematology 1:247-262.
2. Horobin RW, Walter KJ 1987 Understanding Romanowsky staining. I. the Romanowsky-Giemsa effect in blood smears. Azure B-eosin as a substitute for May-Grünwald-Giemsa and Jenner-Giemsa stains. Microscopica Acta 79:153-156.
3. Marshall PN 1978 Romanowsky-type stains in haematology. Histochemical Journal 10:1-29.
4. Wittekind DH, Kretschmer V, Sohmer I 1982 Azure B-eosin Y stain as the standard Romanowsky-Giemsa stain. British Journal of Haematology 5:391-393.
5. International Committee for Standardization in Haematology 1984 ICSH reference method for staining of blood and bone marrow films by azure B and eosin Y (Romanowsky stain). British Journal of Haematology 57:707-710.
6. Schenk EA, Willis CT 1989 Note from the Biological Stain Commission: certification of Wright stain solution. Stain Technology 64:152-153.
7. Wittekind DH 1983 On the nature of Romanowsky-Giemsa staining and its significance for cytochemistry and histochemistry: an overall view. Histochemical Journal 15:1029-1047.
8. Bind M, Huiges W, Halie MR 1985 Stability of azure B-eosin Y staining solutions. British Journal of Haematology 59:73-78.
9. Hayashi M, Gauthier S, Tatsumi N 1996 Evaluation of an automated slide preparation and staining unit. Sysmex Journal International 6:63-69.
10. Field JW 1940-41 The morphology of malarial parasites in thick blood films. IV. The identification of species and phase. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 34:405-414.
11. Field JW 1941-42 Further notes on a method of staining malarial parasites in thick films. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 35:35.
12. Zipursky A, Brown E, Palko J, et al 1983 The erythrocyte differential count in newborn infants. American Journal of Pediatric Hematology and Oncology 5:45-51.
13. Sills RH 1989 Hyposplenism. In: Pochedly C, Sills RH, Schwartz AD (Eds) Disorders of the spleen. Marcel Dekker, New York.
14. Nagel RL, Fabry ME, Steinberg MH 2003 The paradox of Hemoglobin SC disease. Blood Reviews 17:167-178
15. Fohlen-Walter A, Jacob C, Lacompte T, et al 2002 Laboratory identification of cryoglobulinema from automated blood cell counts, fresh blood samples, and blood films. American Journal of Clinical Pathology 117:606-614.
16. Bloemendal H (Ed) 1977 Cell separation methods. Elsevier-North Holland, Amsterdam.
17. Bøyum A 1984 Separation of lymphocytes, granulocytes and monocytes from human blood using iodinated density gradient media. Methods in Enzymology 108:88-102.
18. Efrati P, Rozenszajn L 1960 The morphology of buffy coat in normal human adults. Blood 16:1012-1019.
19. Efrati P, Rozenszajn L, Shapira E 1961 The morphology of buffy coat from cord blood of normal human newborns. Blood 17:497-503.
20. Romsdahl MM, McGrew EA, McGrath RG, et al 1964 Hematopoietic nucleated cells in the peripheral venous blood of patients with carcinoma. Cancer (Philadelphia) 17:1400-1404.
21. Linn YC, Tien SL, Lim LC, et al 1995 Haematophagocytosis in bone marrow aspirate: a review of the clinical course of 10 cases. Acta Haematologica 94:182-191.
22. Islam A 1995 A new, fast and convenient method for layering blood or bone marrow over density gradient medium. Journal of Clinical Pathology 48:686-688
23. Hänscheid T 1999. Diagnosis of malaria: a review of alternatives to conventional microscopy. Clinical and Laboratory Haematology 21:235-245.
24. Moody AH, Chiodini PL 2000 Methods for the detection of blood parasites. Clinical and Laboratory Haematology 22:189-202.
25. Thomson ST, Lohmann RC, Crawford L et al 2000 External quality assessment in the examination of blood films for malaria parasites within Ontario, Canada. Archives of Pathology and Laboratory Medicine 124:57-60.
26. Bell D, GO R, Miguel C et al 2001 Diagnosis of malaria in a remote area of the Philippines: comparison of techniques and their acceptance by health workers and the community. Bulletin of the World Health Organization 79:933-941.
27. Melvin DM, Brooke MM 1955 Triton X-100 in Giemsa staining of blood parasites. Stain Technology 30:269-275.
28. Gleeson RM 1997 An improved method for thick film preparation using saponin as a lysing agent. Clinical and Laboratory Haematology 19:249-251.
29. Lowe BS, Jeffa NF, New L 1996 Acridine orange fluorescence techniques as alternatives to traditional Giemsa staining

for the diagnosis of malaria in developing countries. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 90:30-34.
30. Gay T, Traore B. Zanoni J et al 1996 Direct acridine orange fluorescence examination of blood slides compared to current techniques for malaria diagnosis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 90:516-518.
31. Craig MH, Sharp BL 1997 Comparative evaluation of four techniques for the diagnosis of Plasmodium falciparum infections. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 91:279-282.
32. Bailey W, Smith D 1994 The quantitative buffy coat for the diagnosis of trypanosomes. Tropical Doctor 24:54-56.
33. Ali FMK 1986 Separation of human blood and bone marrow cells. Wright, Bristol.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

5 Morfología de las células sanguíneas normales y patológicas

Barbara J. Bain

Examen de las extensiones sanguíneas 70
Morfología de los hematíes 70
Eritropoyesis anómala 71
- Anisocitosis y poiquilocitosis 71
- Macrocitos 72
- Microcitos 73
- Punteado basófilo 73

Formación inadecuada de hemoglobina 74
- Hipocromasia (hipocromía) 74
- Anisocromasia (anisocromía) y población de hematíes dimórficos 74

Daños a los hematíes tras su formación 75
- Hipercromasia (hipercromía) 75
- Esferocitosis 76
- Hematíes contraídos de forma irregular 77
- Eliptocitosis y ovalocitosis 78

Células espiculadas y fragmentación eritrocitaria 79
- Esquistocitosis (fragmentación) 80
- Queratocitos 81
- Acantocitosis 81
- Equinocitosis 81

Miscelánea de anomalías de los hematíes 82
- Leptocitosis 82
- Células diana 82
- Estomatocitosis 83
- Células falciformes 84
- Poiquilocitos con hemoglobina SC y cristales de hemoglobina C 84
- Inclusiones eritrocitarias 84
- Cuerpos de Howell-Jolly 85
- Cuerpos de Pappenheimer 85
- Formación de *rouleaux* y autoaglutinación 85

Cambios relacionados con un aumento compensador de la eritropoyesis 86
- Policromasia 86
- Eritroblastosis 86

Efectos de la esplenectomía y del hipoesplenismo 87
Microscopia electrónica de barrido 87
Morfología de los leucocitos 89
Neutrófilos polimorfonucleares 90
- Gránulos 90
- Vacuolas 91
- Bacterias 91
- Cuerpos de Döhle 91
- Núcleos 91
- Hipersegmentación 92
- Células de Pelger-Huët 92
- Neutrófilos picnóticos (apoptosis) 93

Eosinófilos 93
Basófilos 93
Monocitos 94
Linfocitos 94
Morfología plaquetaria 96

El examen de una extensión sanguínea fijada y teñida constituye una parte esencial de la investigación hematológica y nunca se insistirá demasiado en que, para obtener la máxima información del examen, las muestras deben estar bien extendidas y bien teñidas, y deben explorarse de manera sistemática. Más adelante se darán los detalles del procedimiento recomendado para el examen.

Hemos descrito e ilustrado las anomalías eritrocitarias más importantes observadas en extensiones fijadas y teñidas y hemos añadido algunas notas sobre su trascendencia y su importancia diagnóstica. También hemos descrito las anomalías leucocitarias y plaquetarias y, en caso de ser conveniente, las hemos ilustrado. Los portaobjetos se tiñeron con May-Grünwald-Giemsa. Las variaciones en el color son el resultado del procesado fotográfico y de la utilización ocasional de un filtro azul para la luz en el microscopio.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

EXAMEN DE LAS EXTENSIONES SANGUÍNEAS

Hay que examinar las extensiones sanguíneas de forma sistemática, observando en primer lugar macroscópicamente la extensión teñida para continuar con el examen microscópico, empezando con la baja resolución y terminando con la alta. No tiene ninguna utilidad depositar una gota de aceite de inmersión aleatoriamente sobre la extensión y examinarla utilizando el objetivo de alta resolución ×100.

En primer lugar, se debe examinar la extensión de forma macroscópica para valorar si la realización de la técnica ha sido satisfactoria y juzgar sus características de tinción y la presencia de cualquier partícula anómala que pudiera corresponderse con grandes agregados plaquetarios, depósitos de crioglobulina o cúmulos de células tumorales. Antes o después de la evaluación macroscópica, se debe cubrir la extensión con un cubreobjetos de vidrio utilizando un medio de montaje neutro. A continuación, hay que inspeccionar la extensión a bajo aumento (con un objetivo ×10 o ×20) para: *a)* hacerse una idea de la calidad de la preparación; *b)* valorar la presencia de hematíes aglutinados, formación excesiva de pilas de monedas *(rouleaux)* o agregación plaquetaria; *c)* valorar la cantidad, la distribución y la tinción de los leucocitos, y *d)* encontrar un área donde los hematíes estén distribuidos de manera uniforme y sin distorsiones. Hay que analizar una gran parte de la extensión para poder detectar las escasas células anómalas que pueda haber, como los ocasionales precursores de los granulocitos o los hematíes nucleados.

Después de seleccionar un área adecuada hay que utilizar un objetivo de inmersión en aceite ×40, ×50 o ×60. Se pueden apreciar mejor las diferencias en el tamaño, en la forma y en la tinción de los hematíes con uno de estos objetivos que con la lente de inmersión en aceite ×100. Así podremos detectar características como la granulación tóxica o la presencia de cuerpos de Howell-Jolly o de Pappenheimer. La parte principal de la evaluación de una extensión sanguínea se realiza habitualmente con esta resolución. El objetivo ×100, junto con los oculares ×6 o ×10, debe utilizarse únicamente para el examen final de las células poco comunes y para observar detalles finos como el punteado basófilo o los bastones de Auer. La necesidad de examinar una extensión con un objetivo ×100 depende de las características clínicas, del recuento sanguíneo y de la naturaleza de cualquier anomalía morfológica detectada a baja resolución.

Dado que el diagnóstico del tipo de anemia o de cualquier otra anomalía presente depende, habitualmente, de la asimilación del cuadro completo que presenta la extensión, se deben examinar de forma sistemática los hematíes, los leucocitos y las plaquetas. El examen de la extensión sirve también para validar el recuento sanguíneo automatizado, distinguiendo, por ejemplo, entre una macrocitosis real y una macrocitosis facticia causada por la presencia de una aglutinina fría y, del mismo modo, entre la trombocitopenia real y la trombocitopenia facticia causada por una agregación plaquetaria o por satelitismo.

MORFOLOGÍA DE LOS HEMATÍES

En el individuo sano, los hematíes varían relativamente poco en su tamaño y en su forma (fig. 5.1). En las extensiones bien realizadas, secas y teñidas, la gran mayoría de las células tienen contornos redondeados y suaves y sus diámetros se encuentran dentro del relativamente estrecho intervalo de 6,0-8,5 mm. Como indicación a grandes rasgos, en una extensión seca el tamaño de un eritrocito normal parece ser el mismo que el del núcleo de un linfocito pequeño (fig. 5.1). Los hematíes se tiñen muy intensamente con el componente eosina de los colorantes de Romanowsky, sobre todo en la periferia de la célula, como consecuencia de la biconcavidad normal de la misma. Una proporción de células pequeña aunque variable (generalmente menos del 10%) en las extensiones bien realizadas tiene una forma claramente oval más que redonda, y un porcentaje muy pequeño puede estar contraído y presentar un contorno irregular o parecer que hubieran perdido parte de su sustancia a consecuencia de una fragmentación (esquistocitos). Según Marsh, el porcentaje de «picnocitos» (células contraídas de forma irregular) y de esquistocitos en la sangre normal no sobrepasa el 0,1% y la proporción es, por lo general, considerablemente menor, mientras que en los lactantes normales a término la proporción es mayor, 0,3-1,9%, y aún más alta en los prematuros, hasta el 5,6%[1].

Los hematíes normales y los patológicos están sujetos a una distorsión considerable al realizar el frotis y, como se ha mencionado anteriormente, es obligatorio examinar las extensiones de forma cuidadosa para encontrar una zona donde los hematíes estén menos distorsionados, antes de intentar examinar las células en detalle. Dicha zona puede encontrarse generalmente hacia la zona de la cola de la extensión, aunque no exactamente en la cola. A menudo, los cilindros se forman con rapidez en la sangre después de la extracción y pueden ser claramente visibles incluso en las extensiones realizadas en la cabecera del enfermo. Son particularmente visibles en las partes más gruesas de la extensión que se han secado con más lentitud. De forma ideal, se deberían examinar los hematíes en un área en la que no

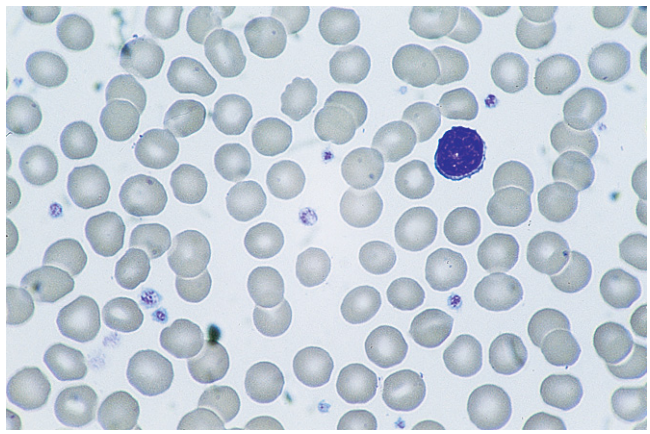


Figura 5.1. Microfotografía de extensiones sanguíneas. Extensión de un adulto sano.

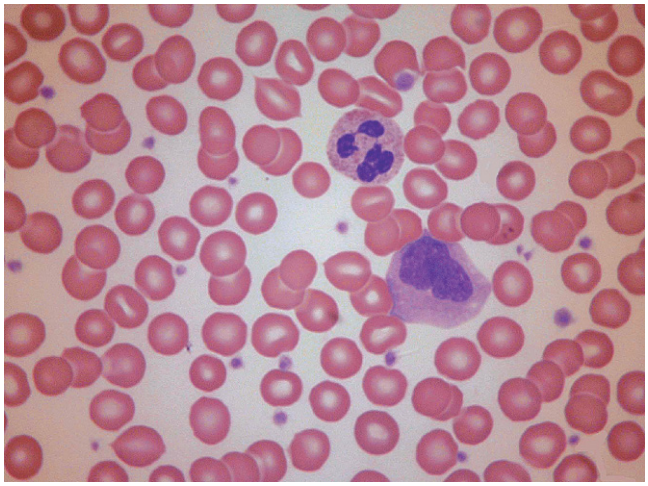


Figura 5.2. Microfotografía de una extensión sanguínea. Grosor ideal para el examen.

haya *rouleaux* y donde las células estén en contacto, pero con escaso solapamiento. La extensión en el área elegida no debe ser tan fina como para causar distorsión de los hematíes; si se examina la cola de la extensión, se puede obtener una falsa impresión de esferocitosis. Los aspectos variables de las diferentes áreas de una misma extensión sanguínea se ilustran en las figuras 5.2, 5.3 y 5.4. El área ilustrada en la figura 5.2 es claramente la mejor para examinar los hematíes con ojo crítico.

Las ventajas y desventajas de examinar los hematíes suspendidos en el plasma se mencionaron brevemente en el capítulo 4 (v. pág. 58). Con este método, se pueden observar los hematíes sin los artefactos producidos por el secado y es posible apreciar mejor y de manera más fiable las anomalías en el tamaño y en la forma que en las extensiones de sangre seca en los portaobjetos. Sin embargo, la facilidad y rapidez con que se pueden realizar las extensiones secas, así como su duración, les dan una enorme ventaja en los estudios de rutina.

En el individuo enfermo, las anomalías en el cuadro eritrocitario se producen por cuatro causas principales:

1. Eritropoyesis anómala que puede ser eficaz o ineficaz.
2. Formación inadecuada de hemoglobina.
3. Daños o cambios que afectan a los hematíes tras abandonar la médula ósea, incluyendo los efectos de una función esplénica reducida o ausente.
4. Intentos de la médula ósea de compensar la anemia con un aumento de la eritropoyesis.

Estos procesos se traducen, respectivamente, en las siguientes anomalías eritrocitarias:

1. Aumento de las variaciones en el tamaño (anisocitosis), en la forma (poiquilocitosis) y punteado basófilo.
2. Contenido de hemoglobina reducido o desigual (hipocromía, anisocromía o dimorfismo).
3. Esferocitosis, contracción irregular, eliptocitosis o fragmentación (esquistocitosis); presencia de cuerpos de Pappenheimer, cuerpos de Howell-Jolly y un número variable de ciertos poiquilocitos específicos (células diana, acantocitos y esferocitos).
4. Signos de inmadurez (policromasia y eritroblastosis).

ERITROPOYESIS ANÓMALA

Anisocitosis (ἄνισος, desigual) y poiquilocitosis (ποικίλος, variado)

La anisocitosis y la poiquilocitosis son características inespecíficas de cualquier trastorno sanguíneo. Los términos implican una mayor variación en el tamaño o en la forma de la que existe normalmente (figs. 5.5 y 5.6). La anisoci-

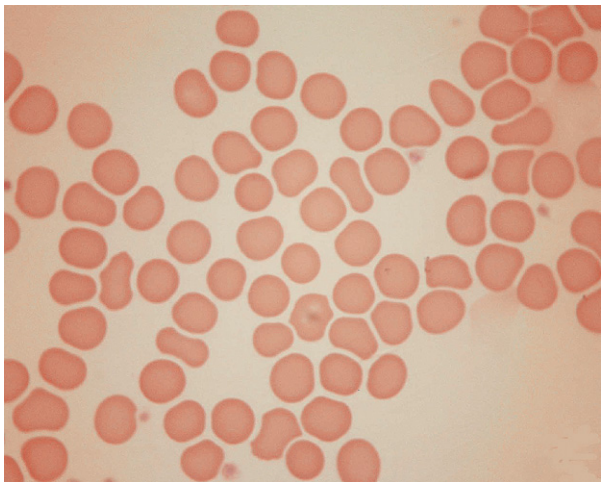


Figura 5.3. Microfotografía de una extensión sanguínea en la que se observa una zona demasiado delgada para el examen (es la misma extensión que en la fig. 5.2)

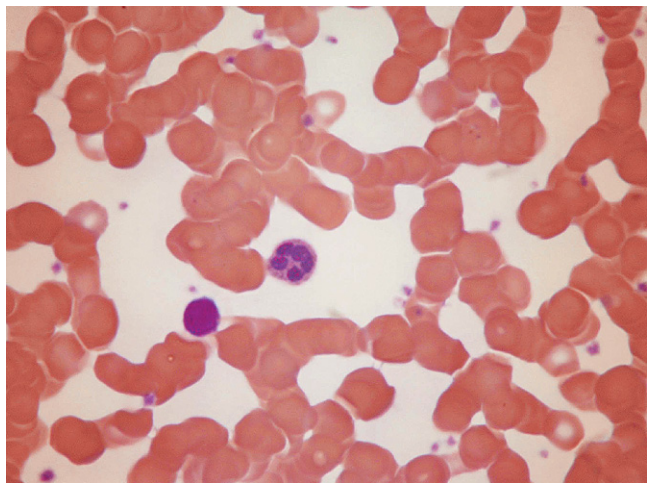


Figura 5.4. Microfotografía de una extensión sanguínea en la que se observa una zona demasiado gruesa para el examen (es la misma extensión que en la fig. 5.2).

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

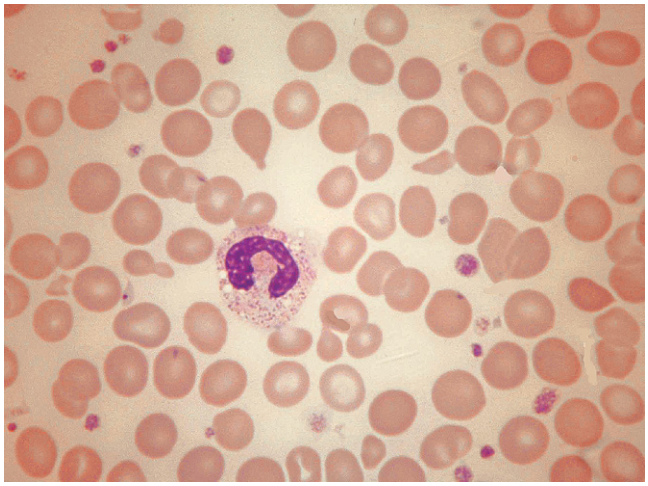


Figura 5.5. Microfotografía de una extensión sanguínea de un paciente con un trastorno mielodisplásico/mieloproliferativo sin clasificar. Muestra anisocitosis, anisocromía y poiquilocitosis moderadas. Hay un neutrófilo con forma en banda.

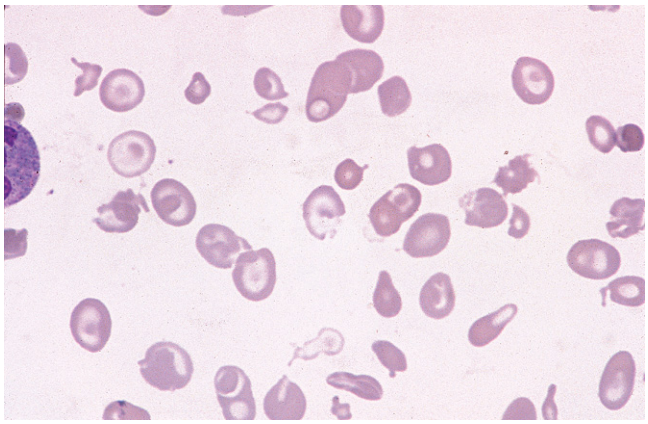


Figura 5.6. Microfotografía de una extensión sanguínea de un paciente con heterocigosidad compuesta para la hemoglobina E y la talasemia β°. Muestra anisocitosis y poiquilocitosis marcada.

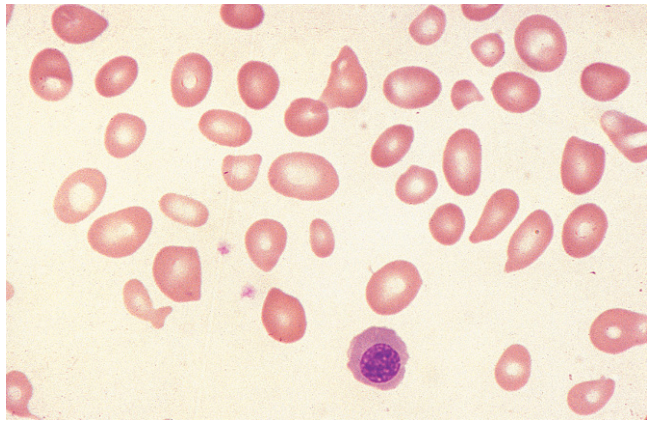


Figura 5.7. Microfotografía de una extensión sanguínea. Anemia perniciosa. Muestra anisocitosis marcada, poiquilocitosis moderada (incluyendo macrocitos ovales y células en lágrima) y un megaloblasto.

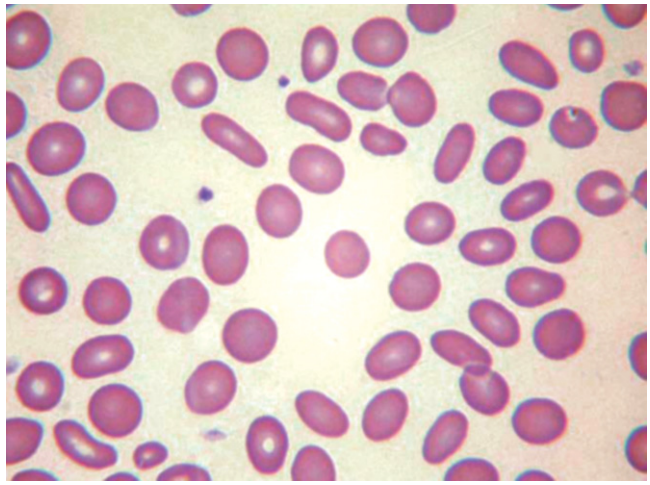


Figura 5.8. Microfotografía de una extensión sanguínea. Mielofibrosis idiopática. Muchos de los hematíes son elípticos u ovales.

tosis puede ser el resultado de la presencia de células mayores de lo normal (macrocitosis), de células menores de lo normal (microcitosis) o de ambas; frecuentemente, se observan tanto macrocitos como microcitos (v. fig. 5.5).

Los poiquilocitos se producen en muchos tipos de eritropoyesis anómala; por ejemplo, la anemia megaloblástica (fig. 5.7), la anemia ferropénica, la talasemia, la mielofibrosis (tanto idiopática como secundaria) (fig. 5.8), la anemia diseritropoyética congénita (fig. 5.9) y los síndromes mielodisplásicos. Los eliptocitos y los ovalocitos se encuentran entre los poiquilocitos y pueden estar presentes cuando existe diseritropoyesis; a menudo, se observan en la anemia megaloblástica (macroovalocitos) y en las anemias ferropénicas («células en lápiz»), pero también pueden encontrarse en los síndromes mielodisplásicos y en la mielofibrosis idiopática (v. fig. 5.8). Se ha observado que el número de eliptocitos y de «poiquilocitos con cola» (poiquilocitos en lágrima) se correlaciona con la gravedad de la anemia ferropénica[2]. Los poiquilocitos no son únicamente característicos de la eritropoyesis alterada, sino que se encuentran también en diversas anemias hemolíticas congénitas causadas por defectos de la membrana y en trastornos adquiridos como la anemia hemolítica microangiopática y el daño oxidativo; en estos trastornos, la anomalía en la forma se produce por el daño a las células después de su formación y se describe más adelante en este capítulo.

Macrocitos

Se encuentran clásicamente en las anemias megaloblásticas (fig. 5.10), pero los macrocitos también están presentes en algunos casos de anemia aplásica, en los síndromes mielodisplásicos y en otros estados diseritropoyéticos. En pacientes tratados con hidroxicarbamida (anteriormente conocida como hidroxiurea), los hematíes son a menudo macrocíticos. Una causa habitual de la macrocitosis es la excesiva ingesta de alcohol y se observa en los alcohólicos y en otros tipos de enfermedad hepática crónica. En estos

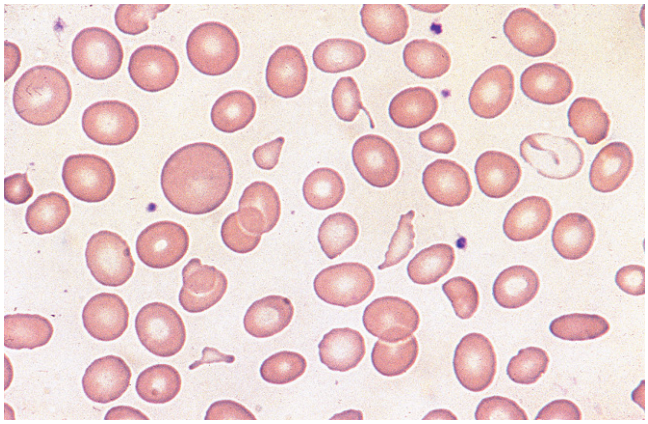


Figura 5.9. Microfotografía de una extensión sanguínea. Anemia diseritropoyética congénita tipo II. Muestra anisocitosis marcada, poiquilocitosis marcada, un macrocito inhabitualmente grande y una célula notablemente hipocrómica.

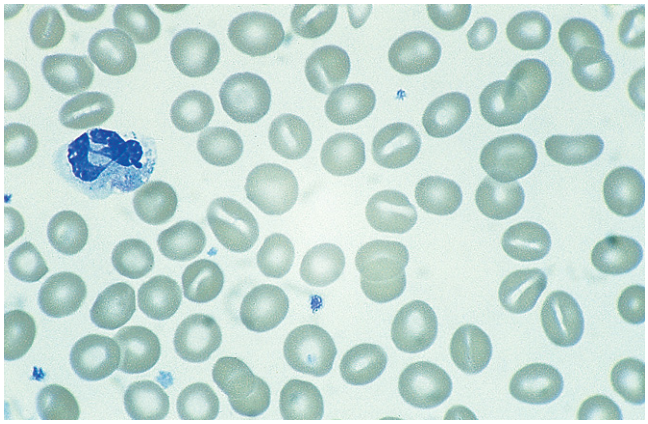


Figura 5.11. Microfotografía de una extensión sanguínea. Hepatopatía. Muestra macrocitosis y estomatocitosis.

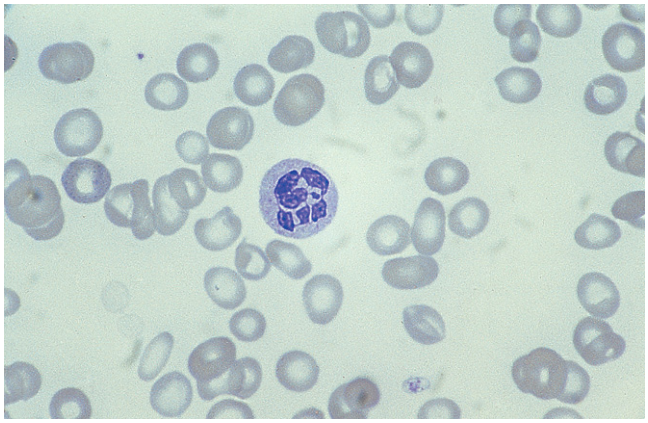


Figura 5.10. Microfotografía de una extensión sanguínea. Anemia megaloblástica. Muestra macrocitos, macrocitos ovales y un neutrófilo hipersegmentado.

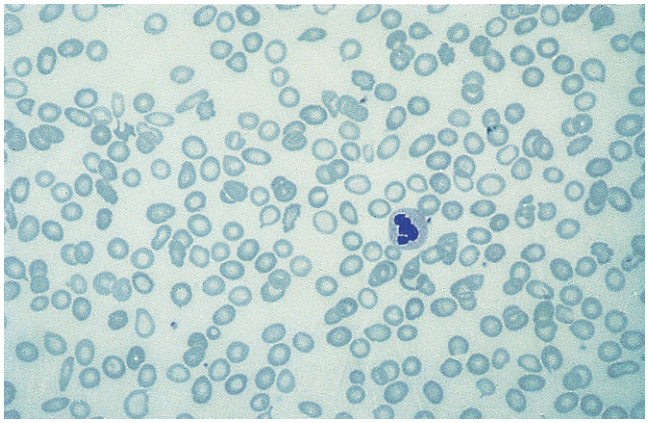


Figura 5.12. Microfotografía de una extensión sanguínea. Anemia ferropénica. Muestra hipocromía, microcitosis y poiquilocitosis.

trastornos, los hematíes tienden a presentar uniformidad en el tamaño y en la forma, y pueden aparecer también estomatocitos (fig. 5.11). En el poco frecuente tipo III de la anemia diseritropoyética congénita, algunos de los macrocitos tienen un tamaño excepcional. Otra causa rara de macrocitosis es la macrocitosis familiar benigna[3]. También aparece macrocitosis cuando hay una tasa aumentada de eritropoyesis, debido a la presencia de reticulocitos. Su presencia se sospecha en las extensiones teñidas de forma rutinaria por la ligera basofilia, que da lugar a policromasia (v. pág. 86) y se confirma fácilmente por medio de colorantes especiales (p. ej., el nuevo azul de metileno, v. pág. 34). Hay que diferenciar estos macrocitos policromáticos de los demás macrocitos porque su importancia diagnóstica es bastante diferente.

Microcitos

La presencia de microcitos suele ser el resultado de un defecto en la formación de hemoglobina. La microcitosis es característica de la anemia ferropénica (fig. 5.12), de diversos tipos de talasemia (fig. 5.13) y de los casos graves de anemia de las enfermedades crónicas. Las causas más raras incluyen las anemias sideroblásticas congénitas y adquiridas. La microcitosis relacionada con un defecto en la síntesis de hemoglobina debe diferenciarse de la fragmentación eritrocitaria o de la esquistocitosis (v. pág. 80). Ambas anomalías pueden producir una reducción del volumen corpuscular medio (VCM). Sin embargo, hay que remarcar que es habitual encontrar un VCM bajo asociado con un defecto en la síntesis de hemoglobina, mientras que es inusual en los síndromes de fragmentación ya que los fragmentos corresponden, por lo general, a un pequeño porcentaje de hematíes.

Punteado basófilo

El punteado basófilo indica la presencia de numerosos gránulos basófilos distribuidos por toda la célula (fig. 5.14) y que, al contrario de lo que ocurre con los cuerpos de Pappenheimer (v. más adelante), no dan una reacción de Perls positiva para el hierro ionizado. El punteado basófilo tiene

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

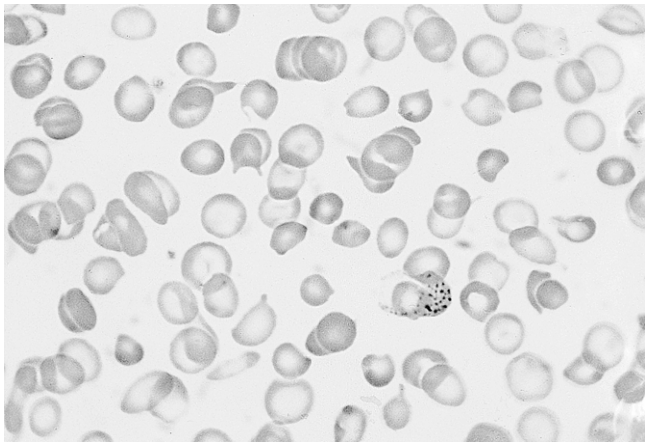


Figura 5.13. Hemoglobina heterocigota D-Punjab/β talasemia. Muestra anisocitosis, poiquilocitosis, hipocromía, microcitosis y punteado basófilo.

un significado bastante diferente de la basofilia citoplasmática difusa. Indica una alteración de la eritropoyesis más que un aumento de la misma.

Se produce en muchas enfermedades sanguíneas: talasemia, anemias megaloblásticas, infecciones, hepatopatías, intoxicación por plomo y otros metales pesados, hemoglobinas inestables y deficiencia de pirimidina-5′-nucleotidasa[4].

FORMACIÓN INADECUADA DE HEMOGLOBINA

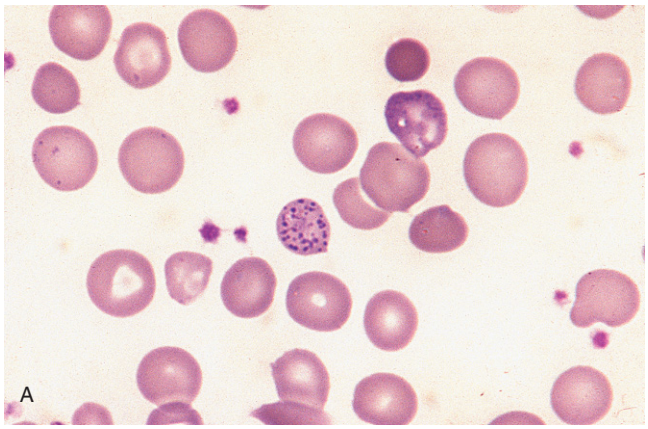
Hipocromasia (hipocromía) (ὑπο-, bajo)

El término *hipocromasia*, o el ahora más habitual, hipocromía, hace alusión a la presencia de hematíes con una tinción inusualmente pálida. (En los casos dudosos, lo prudente es comparar la tinción de la extensión sospechosa con la de una extensión normal teñida al mismo tiempo.)

Hay dos causas posibles: una concentración reducida de hemoglobina o un grosor anómalo de los hematíes. La concentración reducida de hemoglobina se produce por una síntesis alterada de la misma. Puede provenir de un fallo en la síntesis del grupo hem (la deficiencia de hierro es una causa muy habitual [fig. 5.15] y la anemia sideroblástica [fig. 5.16] una causa rara) o de un fallo en la síntesis de la globina como en las talasemias (fig. 5.17). La síntesis de la hemoglobina también puede estar alterada en las infecciones crónicas y en otros trastornos inflamatorios. Nunca se insistirá demasiado en que un cuadro sanguíneo hipocrómico no significa necesariamente una deficiencia de hierro, aunque ésta sea la causa más habitual. En la deficiencia de hierro, los hematíes son, de forma característica, hipocrómicos y microcíticos, pero el grado de estas anomalías depende de la gravedad; la hipocromía puede ser menor y pasarse por alto si la concentración de hemoglobina (Hb) excede los 100 g/l. En las talasemias heterocigotas α+ o α° o en la talasemia β heterocigota, la hipocromía es a menudo menos marcada en relación con el grado de microcitosis que en la deficiencia de hierro. La presencia de células diana o de punteado basófilo es también más indicativa de rasgo talasémico que de deficiencia de hierro. En la talasemia β homocigota, las anomalías son mayores que en la deficiencia de hierro con el mismo valor de Hb y habitualmente se encuentran hematíes nucleados, que no son característicos de la deficiencia de hierro. Si se hacen transfusiones al paciente de forma regular, también se pueden observar las células normales del donante (fig. 5.18).

Anisocromasia (anisocromía) (ἄνισος, desigual) y población de hematíes dimórficos

Hay que diferenciar entre la anisocromía, en la que hay una variabilidad anómala en la tinción de los hematíes, y el cuadro dimórfico, en el que hay dos poblaciones de hematíes diferentes. La anisocromía, en la que algunos pero



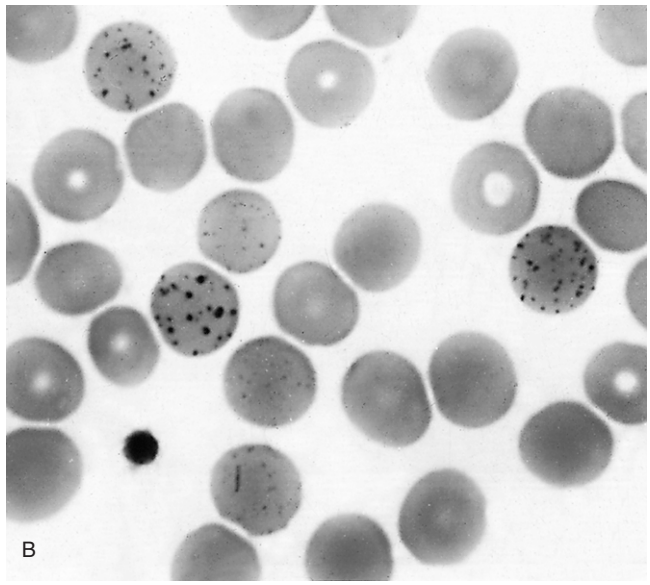


Figura 5.14. Microfotografías de una extensión sanguínea. A: Rasgo talasémico β; muestra hipocromía, microcitosis y punteado basófilo. B: Porfiria eritropoyética; muestra un punteado basófilo prominente.

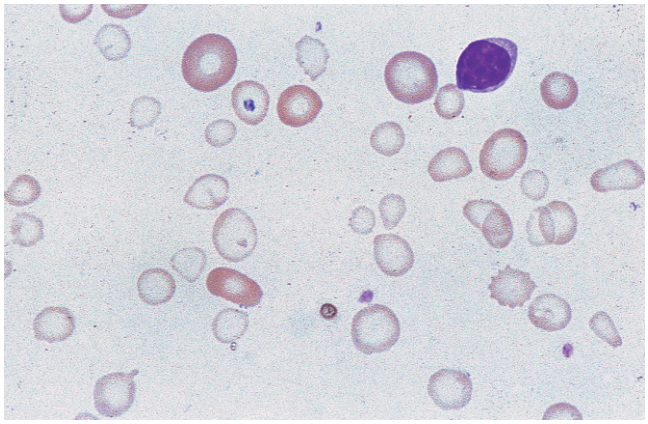


Figura 5.15. Microfotografía de una extensión sanguínea. Anemia ferropénica. Muestra un grado marcado de hipocromía, microcitosis, anisocitosis marcada y poiquilocitosis leve; hay algunas células con hemoglobinización normal.

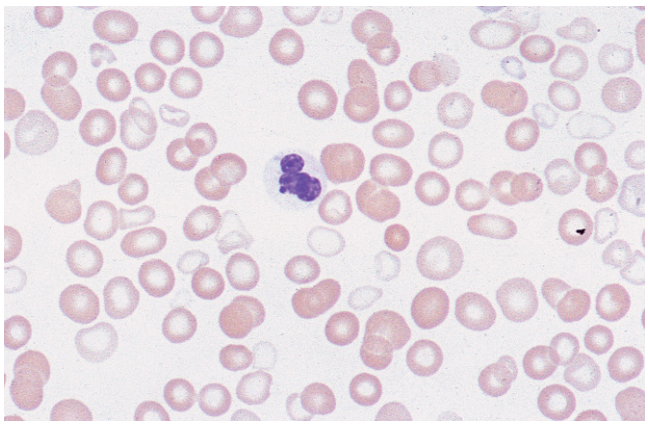


Figura 5.16. Microfotografía de una extensión sanguínea. Anemia sideroblástica adquirida (anemia refractaria con sideroblastos en anillo). Muestra una extensión sanguínea dimórfica con una mezcla de células normocíticas, normocrómicas y microcitos hipocrómicos; hay también diversos macrocitos policromáticos.

no todos los hematíes se tiñen de forma pálida, es característica de una situación cambiante. Puede ocurrir durante el desarrollo o la resolución de una anemia ferropénica (fig. 5.19) o en la anemia de una enfermedad crónica. En cambio, en el rasgo talasémico la anisocromía es mucho menos habitual. Una extensión sanguínea dimórfica puede observarse en diversas circunstancias. Puede ocurrir cuando una anemia ferropénica responde a la terapia férrica tras la transfusión de sangre normal a un paciente con anemia hipocrómica (v. fig. 5.19) y en la anemia sideroblástica (fig. 5.20). En la anemia sideroblástica adquirida, como signo de mielodisplasia, las dos poblaciones celulares suelen ser hipocrómicas-microcíticas y normocrómicas-macrocíticas, respectivamente.

DAÑOS A LOS HEMATÍES TRAS SU FORMACIÓN

La poiquilocitosis se puede producir no solamente debido a una eritropoyesis anómala sino también por daños a los hematíes tras su formación. Los daños pueden ser consecuencia de una anomalía intrínseca del eritrocito, como una hemoglobinopatía, de un defecto de la membrana o de un defecto enzimático que hace que la célula tienda a presentar alteraciones en la forma. La poiquilocitosis puede también originarse por causas extrínsecas, como el daño a los hematíes producido por fármacos, productos químicos o tóxicos; por el calor, o por fuerzas mecánicas anómalas. Las formas específicas de los poiquilocitos sugieren diferentes factores etiológicos.

Hipercromasia (hipercromía) (ὑπερ-, sobre)

La tinción extraordinariamente intensa de los hematíes con falta de la palidez central se puede observar en dos circunstancias: *a)* en presencia de macrocitos, y *b)* cuando existen células anormalmente redondeadas. En la macroci-

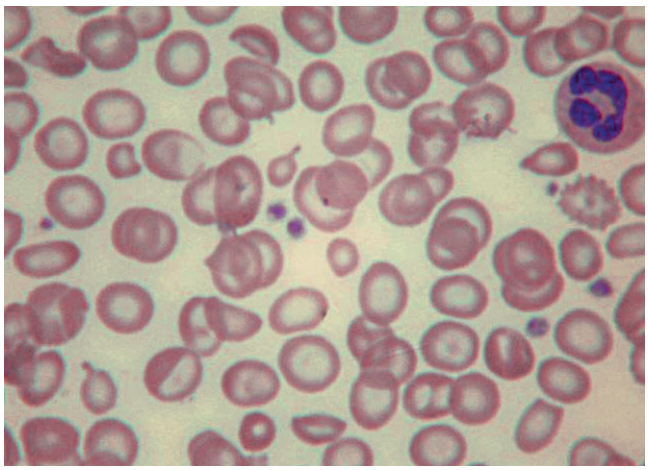


Figura 5.17. Microfotografía de una extensión sanguínea. Enfermedad por hemoglobina H. Muestra microcitosis, hipocromía moderada, anisocitosis moderada y algunos poiquilocitos (incluyendo poiquilocitos en lágrima y fragmentos de hematíes).

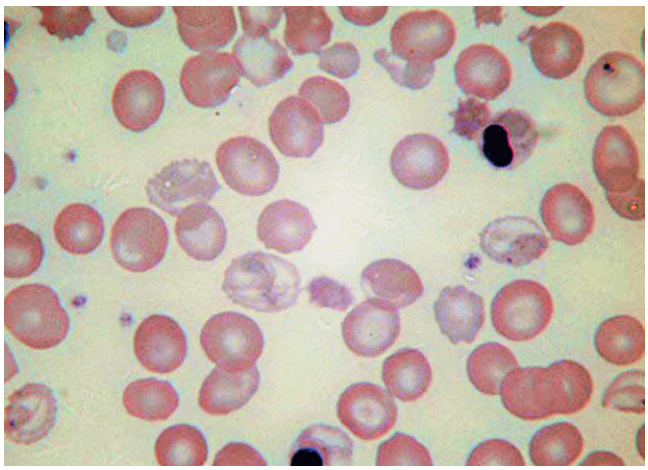


Figura 5.18. Microfotografía de una extensión sanguínea. Talasemia β mayor. Muestra una extensión sanguínea dimórfica. Las células normales son células transfundidas. Las células propias del paciente muestran una hipocromía grave. Hay tres hematíes nucleados.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

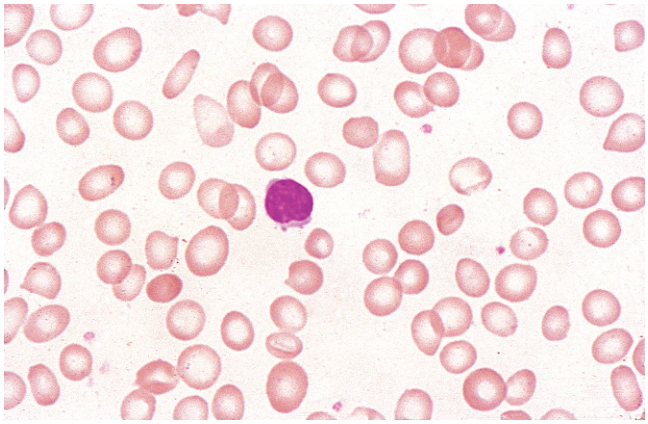


Figura 5.19. Microfotografía de una extensión sanguínea. Anemia ferropénica. Muestra una degradación constante de la hemoglobinización de las células (es decir, anisocromía). Se observa un eliptocito.

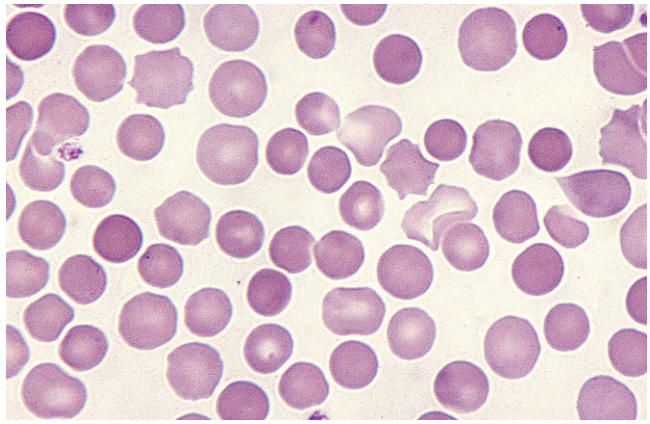


Figura 5.21. Microfotografía de una extensión sanguínea. Esferocitosis hereditaria. Muestra un grado moderado de esferocitosis y de anisocitosis. Obsérvese el contorno redondo de los esferocitos.

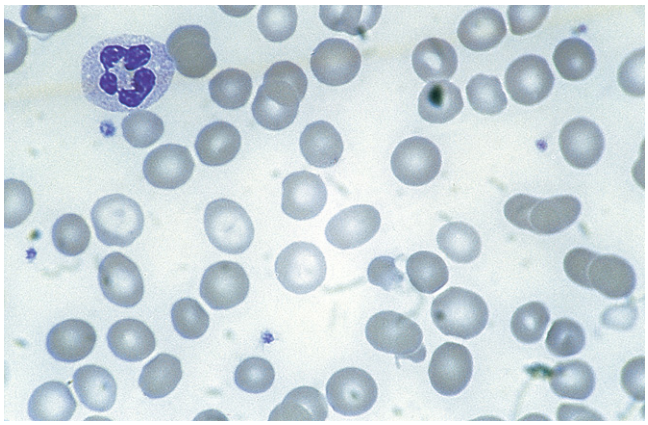


Figura 5.20. Microfotografía de una extensión sanguínea. Anemia sideroblástica adquirida. Muestra dos poblaciones celulares distintas: células hipocrómicas, que tienden también a ser microcíticas, y células normocrómicas normocíticas.

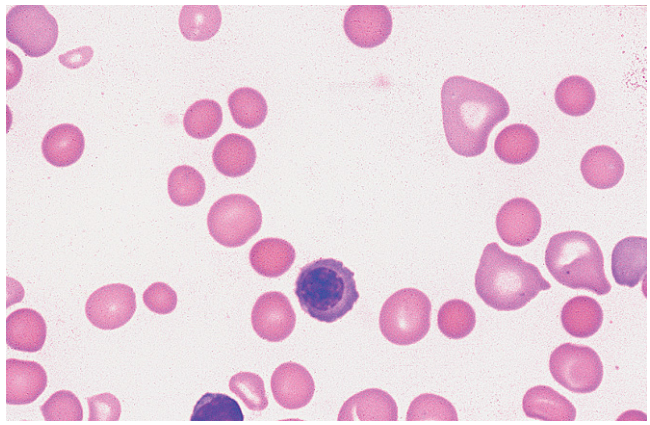


Figura 5.22. Microfotografía de una extensión sanguínea. Enfermedad hemolítica ABO del recién nacido. La esferocitosis es intensa y hay diversos macrocitos policromáticos.

tosis, como en la sangre neonatal y en las anemias megaloblásticas, el aumento del grosor de los hematíes es lo que origina la hipercromía, mientras que la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) es normal. Cuando la hipercromía se produce por células de forma anómala, el grosor de los hematíes es mayor de lo normal y la CHCM está aumentada. Las células redondeadas de forma anómala pueden ser esferocitos o células contraídas irregularmente. La distinción entre estos dos tipos celulares tiene importancia diagnóstica.

Esferocitosis (σφαῖρα, esfera)

Los esferocitos son células más esferoides (es decir, con menos forma de disco) que los hematíes normales, aunque mantienen una silueta regular. Su diámetro es menor y su grosor mayor de lo normal. Sólo en casos extremos tienen una forma casi completamente esférica. Es útil realizar la distinción entre los esferocitos de tamaño normal y los microesferocitos; estos últimos se producen por la fragmentación de los hematíes o por la eliminación de una proporción considerable de la membrana eritrocitaria por parte de los macrófagos esplénicos o de otros macrófagos. Los esferocitos pueden ser el resultado de defectos genéticos de la membrana eritrocitaria, como en la esferocitosis hereditaria (fig. 5.21); de la interacción entre los hematíes recubiertos de inmunoglobulina (o de complemento) y las células fagocíticas, como en la enfermedad hemolítica ABO del recién nacido (fig. 5.22) y en la anemia hemolítica autoinmune (fig. 5.23), y de la acción de toxinas bacterianas (p. ej., la lecitinasa del *Clostridium perfringens*; fig. 5.24).

Los esferocitos aparecen, por lo general, con un contorno redondo perfecto en las extensiones teñidas; hay que distinguirlos cuidadosamente tanto de las células contraídas irregularmente como de las «esferas crenadas» o esferoequinocitos (fig. 5.25), que son el resultado final de la crenación (v. pág. 81). Los esferoequinocitos se desarrollan como artefactos, sobre todo en la sangre que se ha mantenido en conserva antes de realizar las extensiones (figura 5.26). Los esferoequinocitos están también presentes en

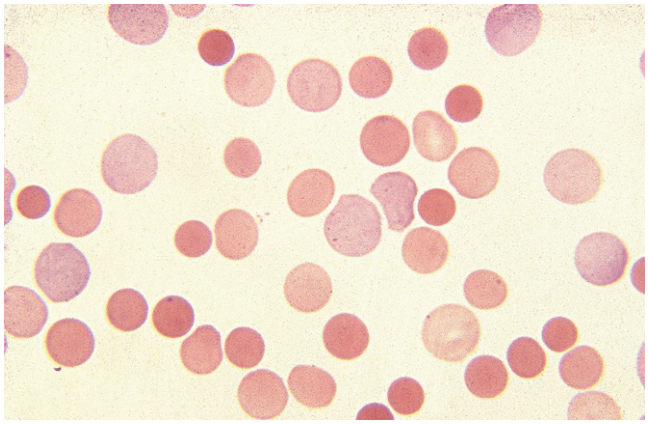


Figura 5.23. Microfotografía de una extensión sanguínea. Anemia hemolítica autoinmunitaria. Muestra esferocitosis y anisocitosis marcadas. Hay numerosos macrocitos policromáticos.

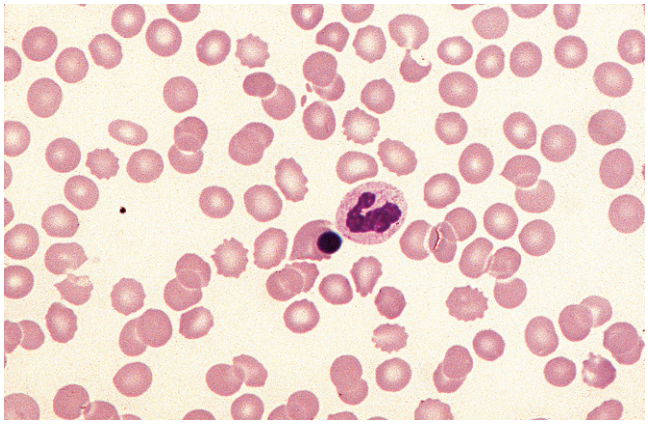


Figura 5.25. Microfotografía de una extensión sanguínea. Intoxicación por clorato sódico. Muestra esferoequinocitos, un queratocito y un eritrocito nucleado.

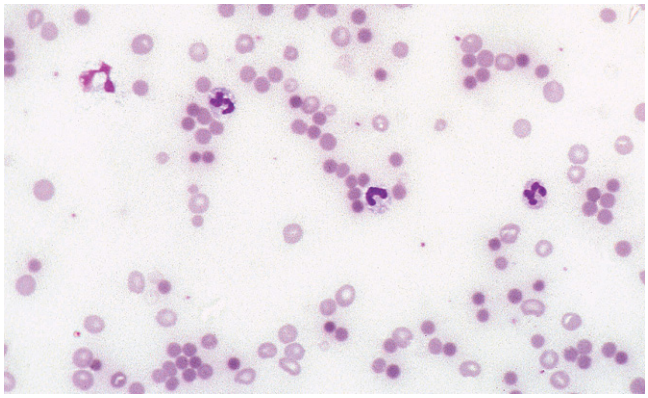


Figura 5.24. Microfotografía de una extensión sanguínea. Septicemia por *Clostridium perfringens*. Muestra un grado extremo de esferocitosis; obsérvese el contorno redondo de los esferocitos. Un cuadro marcadamente dimórfico.

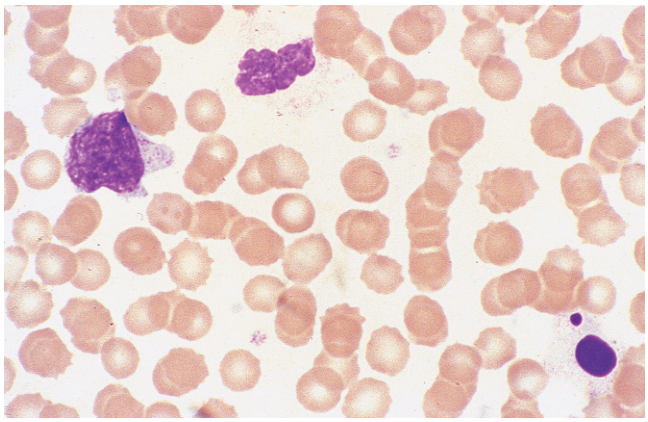


Figura 5.26. Microfotografía de una extensión sanguínea. Sangre normal tras 24 h a 20 °C. Muestra un grado marcado de crenación; hay cambios degenerativos en los leucocitos.

la sangre de los pacientes con esferocitosis hereditaria que han sido esplenectomizados. La extensión sanguínea de un paciente transfundido con sangre almacenada puede mostrar un porcentaje de esferoequinocitos (fig. 5.27).

Hematíes contraídos de forma irregular

Hay diversas causas que producen células contraídas irregularmente. En las anemias hemolíticas inducidas por fármacos o por productos químicos, una parte de los hematíes son más pequeños de lo normal y se tiñen de forma inhabitualmente densa (es decir, aparecen contraídos) y sus bordes son ligera o moderadamente irregulares, pudiendo ser parcialmente cóncavos (fig. 5.28). Pueden corresponder a células cuyos cuerpos de Heinz han sido extraídos por el bazo. Células similares pueden observarse en las extensiones de algunas hemoglobinopatías inestables antes de la esplenectomía (p. ej., las causadas por la presencia de Hb Köln o la Hb St. Mary; fig. 5.29), en la homocigosidad de la hemoglobina E (fig. 5.30) y, en menor grado, en la heterocigosidad de la hemoglobina E. Los cuerpos de Heinz no

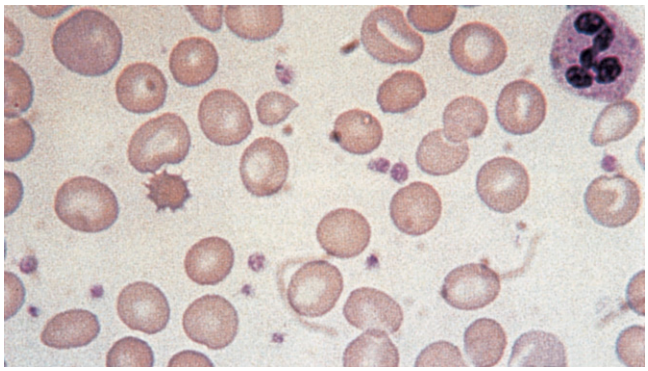


Figura 5.27. Microfotografía de una extensión sanguínea. Postransfusión. Se observa un esferoequinocito.

son visibles normalmente en las extensiones sanguíneas teñidas con Romanowsky, pero pueden apreciarse en tales extensiones como cuerpos que se tiñen de un rosa pálido en el borde celular o, incluso, haciendo protrusión desde los hematíes en las anemias hemolíticas con hemoglobina

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

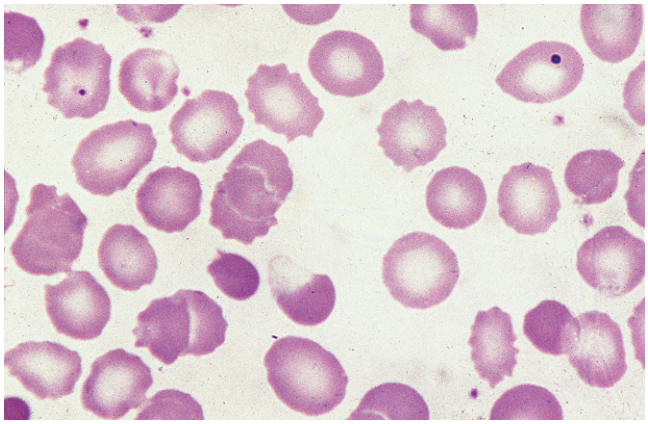


Figura 5.28. Microfotografía de una extensión sanguínea. Anemia hemolítica causada por una sobredosis de fenacetina. Muestra cuatro células irregularmente contraídas y crenación.

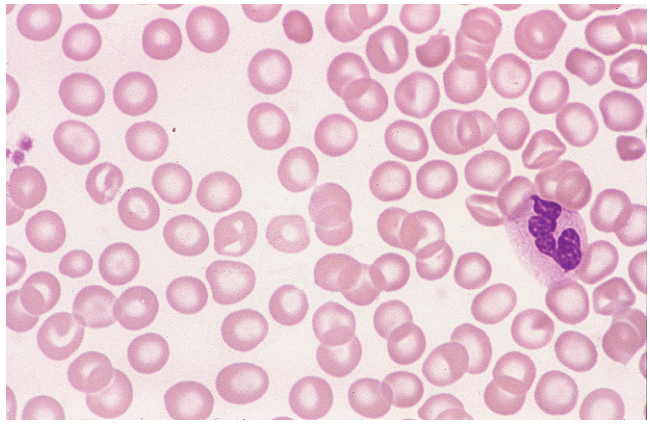


Figura 5.30. Microfotografía de una extensión sanguínea. Homocigosidad para la hemoglobina E. Se observan cuatro células irregularmente contraídas y células diana.

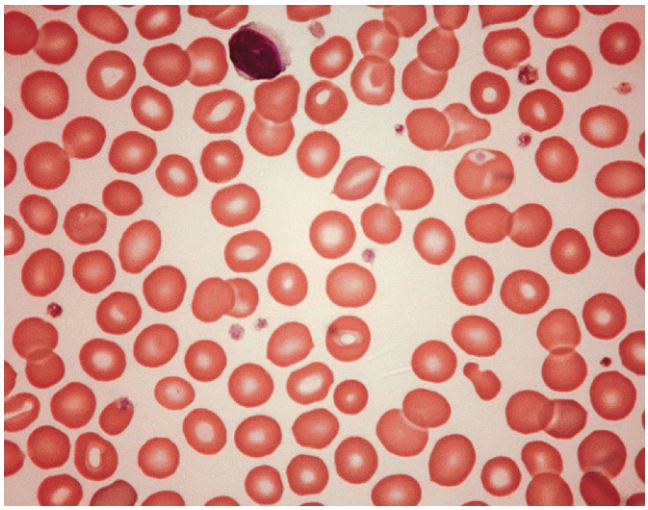


Figura 5.29. Microfotografía de una extensión sanguínea. Anemia hemolítica con hemoglobina inestable (hemoglobina de St. Mary). Muestra diversas células irregularmente contraídas.

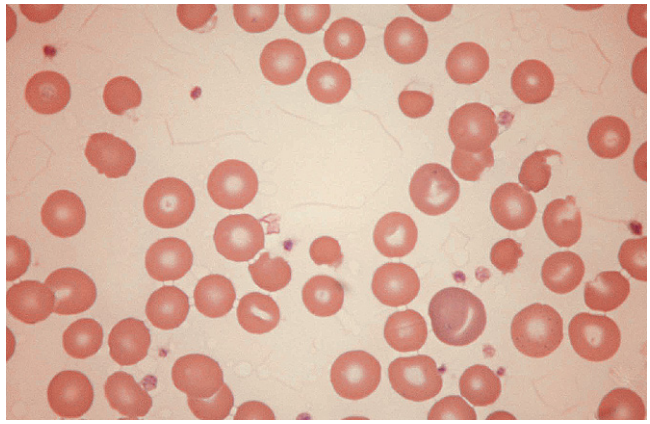


Figura 5.31. Microfotografía de una extensión sanguínea. Favismo. Muestra numerosas células marcadamente contraídas. Obsérvese la condensación y la contracción de la hemoglobina a partir de la membrana celular.

inestable tras la esplenectomía y en las anemias hemolíticas agudas inducidas por oxidantes. Un grado extremo de contracción irregular es característico del favismo grave o de cualquier otro episodio hemolítico agudo en individuos con deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; es típico encontrar células en las que la hemoglobina parece haberse contraído fuera de la membrana celular, un aspecto al que a veces nos referimos como semifantasmal (figura 5.31). Las células contraídas de forma irregular se pueden observar en pequeñas cantidades en el rasgo talasémico β y en la heterocigosidad para la hemoglobina C. Puede haber un número considerable en la homocigosidad para la hemoglobina C, y en este trastorno también pueden encontrarse cristales de hemoglobina C (fig. 5.32).

Un tipo de contracción irregular de origen desconocido se ha descrito con el término de «picnocitosis»[5]. Los picnocitos se parecen mucho a los hematíes dañados químicamente. Como ya se ha mencionado (v. pág. 71), se puede encontrar un número pequeño de picnocitos en la sangre de los lactantes en las primeras semanas de vida, sobre todo en los prematuros. El término «picnocitosis infantil» se refiere a una anemia hemolítica transitoria, relacionada con la deficiencia de glutatión peroxidasa y de selenio que afecta a los lactantes que presentan muchos picnocitos (fig. 5.33)[5,6].

Eliptocitosis y ovalocitosis

Los eliptocitos se hallan a menudo presentes en grandes cantidades en la eliptocitosis hereditaria (fig. 5.34). En la piropoiquilocitosis hereditaria, los eliptocitos son sólo uno de los muchos tipos de poiquilocitos presentes (fig. 5.35). La ovalocitosis del sudeste asiático se caracteriza por la presencia de un número variable de eliptocitos, macroovalocitos y estomatocitos (fig. 5.36). En todos estos trastornos, los reticulocitos tienen un perfil redondeado (es decir, la célula adopta una forma anómala únicamente en los úl-

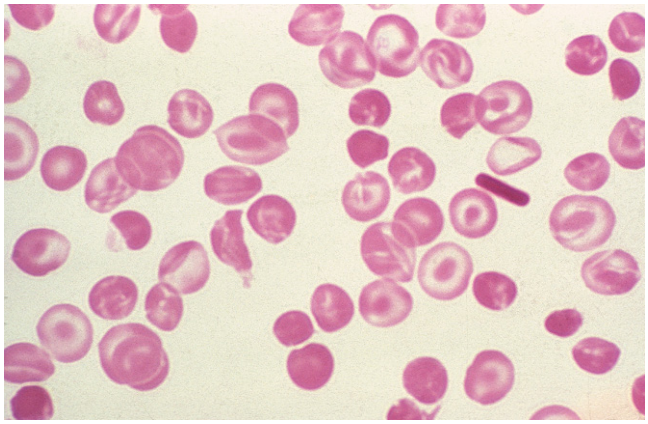


Figura 5.32. Microfotografía de una extensión sanguínea. Enfermedad de la hemoglobina C (homocigosidad para la hemoglobina C). Muestra muchas células diana, células contraídas irregularmente y un cristal de hemoglobina C. A veces es evidente que los cristales de hemoglobina C se encuentran en el interior de membranas de hematíes vacíos.

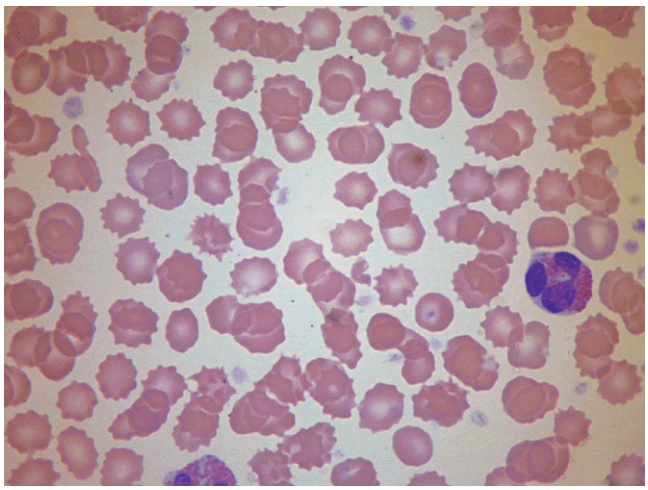


Figura 5.33. Microfotografía de una extensión sanguínea. Picnocitosis infantil. Muestra células contraídas irregularmente similares a las observadas en las anemias hemolíticas inducidas por productos químicos o por fármacos.

timos estadios de maduración). Son, por tanto, defectos adquiridos de la forma del eritrocito, aunque el trastorno causal es heredado.

CÉLULAS ESPICULADAS Y FRAGMENTACIÓN ERITROCITARIA

La terminología aplicada a las células espiculadas ha sido confusa porque los mismos términos se han utilizado para designar diferentes tipos celulares. Por esta razón, se debe desechar la denominación «célula en erizo» y adoptar los términos recomendados por Bessis[7]. Basándose en la microscopia electrónica de barrido (analizada más adelante), distinguió cuatro tipos de células espiculadas: esquistocito,

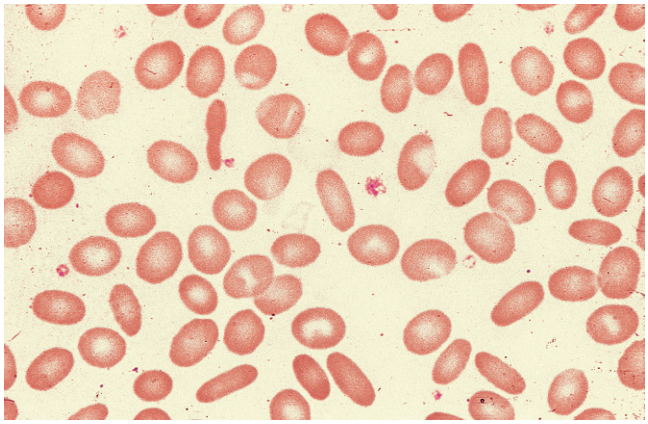


Figura 5.34. Microfotografía de una extensión sanguínea. Eliptocitosis hereditaria. Muchas de las células son elípticas y otras son ovales.

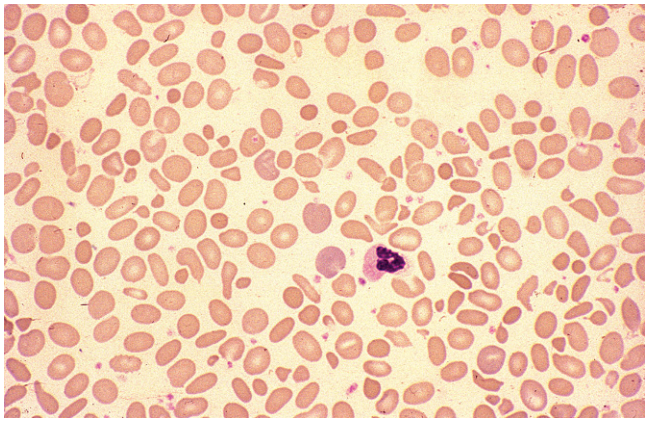


Figura 5.35. Microfotografía de un niño con piropoiquilocitosis hereditaria. Muestra esferocitos, eliptocitos, fragmentos de hematíes y macrocitos policromáticos.

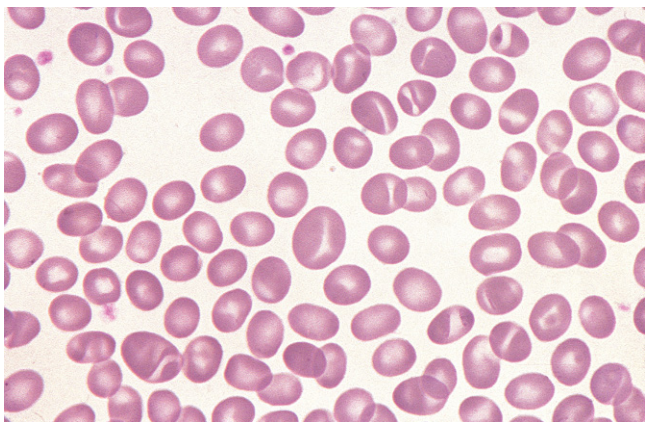


Figura 5.36. Microfotografía de una extensión sanguínea. Ovalocitosis del sudeste asiático. Muestra estomatocitos, macroestomatocitos y macroovalocitos.

queratocito, acantocito y equinocito. El término *equinocito* se utiliza para la célula crenada. Se diferencia del acantocito en el número, la forma y la disposición de las espículas.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

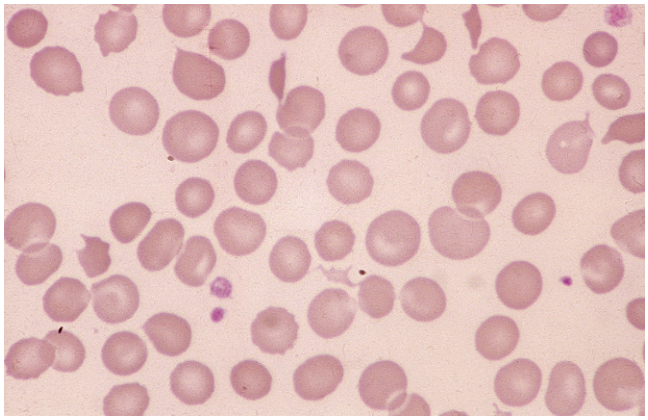


Figura 5.37. Microfotografía de una extensión sanguínea. Anemia hemolítica microangiopática. Muestra fragmentos de hematíes angulares.

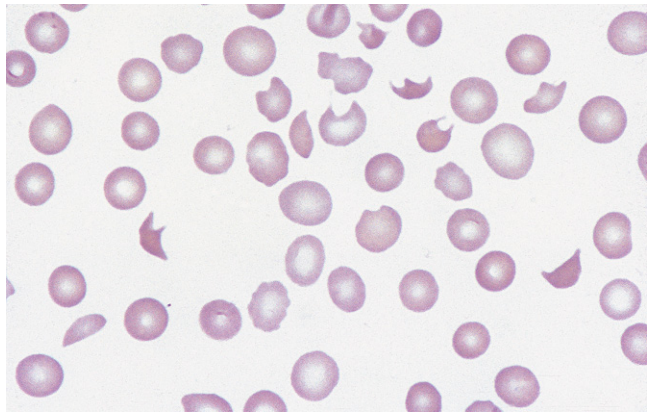


Figura 5.39. Microfotografía de una extensión sanguínea. Anemia hemolítica microangiopática. Muestra numerosos fragmentos de hematíes de formas raras.

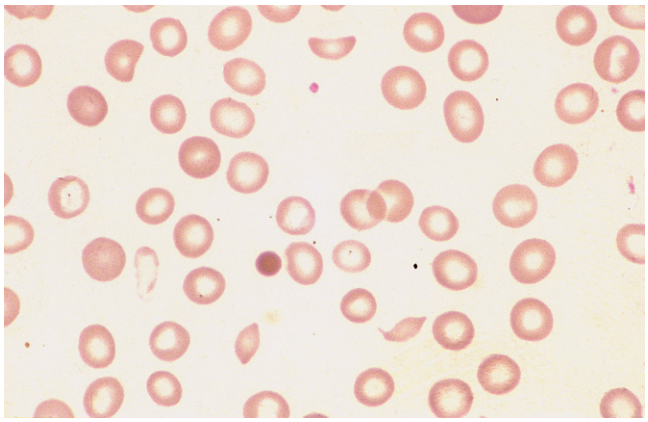


Figura 5.38. Microfotografía de una extensión sanguínea. Anemia hemolítica microangiopática en el lupus eritematoso sistémico. Muestra un microesferocito muy denso y fragmentos de hematíes.

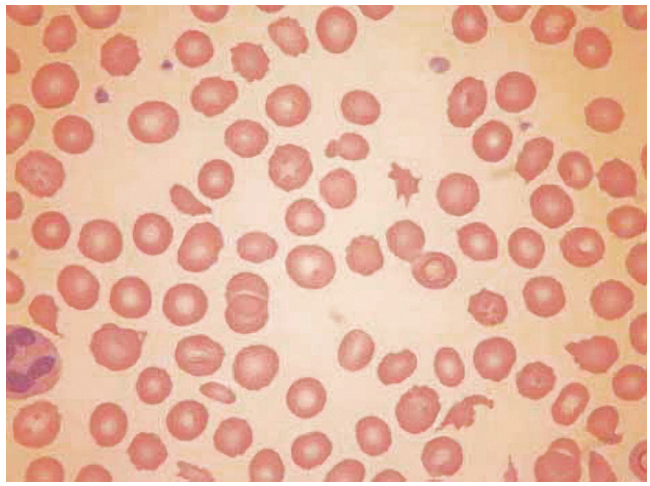


Figura 5.40. Microfotografía de una extensión sanguínea. Anemia hemolítica poscirugía cardíaca. Muestra numerosos fragmentos celulares con morfología irregular.

Esquistocitosis (fragmentación) (σχιστός, hendidura)

Los esquistocitos, o fragmentos eritrocitarios, se encuentran en muchas enfermedades sanguíneas. Son más pequeños que los hematíes normales y tienen formas variables. A veces presentan ángulos agudos o espinas (espuelas) y a veces tienen un perfil redondeado; por lo general se tiñen intensamente, pero en ocasiones son pálidos como resultado de la pérdida de hemoglobina en el momento de la fragmentación. Si son redondeados y se tiñen de forma compacta pueden denominarse microesferocitos. Se presentan en las siguientes situaciones:

1. En ciertos trastornos determinados genéticamente (p. ej., en las talasemias, en la anemia diseritropoyética congénita y en la piropoiquilocitosis hereditaria).
2. En trastornos adquiridos de la formación de hematíes cuando la eritropoyesis es megaloblástica o diseritropoyética.
3. Como consecuencia de un estrés mecánico (p. ej., en las anemias hemolíticas microangiopáticas; figs. 5.37-5.39) y en las anemias hemolíticas cardíacas causadas, la mayoría de las veces, por un escape perivalvular acompañado de turbulencia del flujo ventricular izquierdo (fig. 5.40).
4. Como resultado de una lesión térmica directa como en las quemaduras graves (fig. 5.41).

En las quemaduras, los esquistocitos son a menudo redondeados, pudiendo ser microesferocitos o fragmentos muy pequeños con forma de disco. Además, se puede observar que los hematíes producen pequeñas gemaciones redondeadas de citoplasma. Frecuentemente, como por ejemplo en el síndrome hemolítico urémico en niños, el cuadro sanguíneo se hace más complejo por la superposición de grados diversos de cambios equinocíticos. Los esquistocitos son también característicos de la púrpura trombótica trombocitopénica[8].

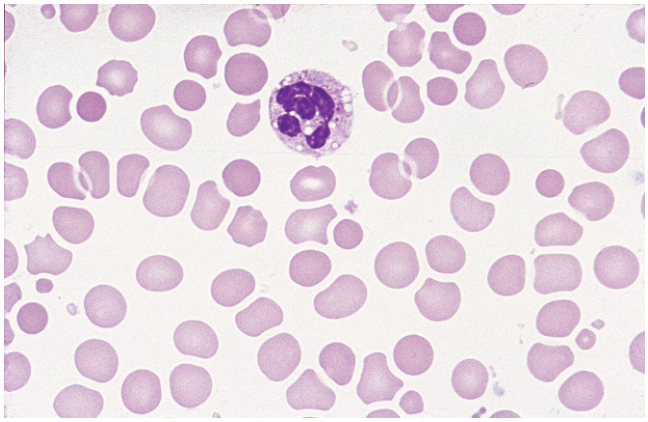


Figura 5.41. Microfotografía de una extensión sanguínea. Quemaduras graves. Muestra muchos fragmentos de hematíes muy pequeños y redondeados (microesferocitos) y una célula crenada.

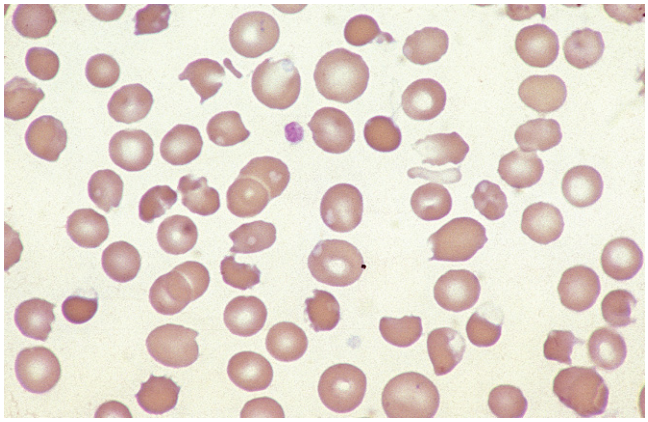


Figura 5.43. Microfotografía de una extensión sanguínea. Anemia hemolítica causada por dapsona. Muestra muchas células contraídas de forma irregular, tres células con hemoglobina retraída a partir de la membrana del eritrocito y un queratocito.

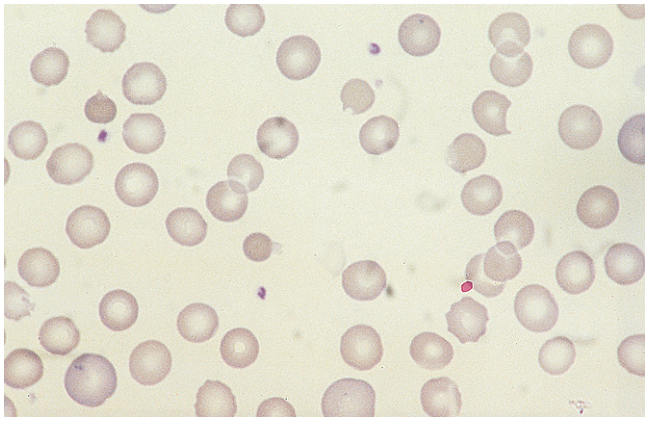


Figura 5.42. Microfotografía de una extensión sanguínea. Queratocitos y células contraídas de forma irregular en un paciente con hemólisis causada por deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

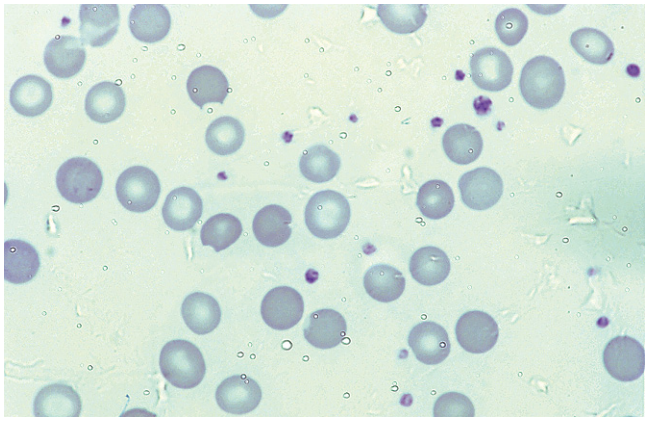


Figura 5.44. Microfotografía de una extensión sanguínea. Dos queratocitos en un paciente con anemia hemolítica microangiopática.

Queratocitos (κέρας, cuerno)

Los queratocitos tienen pares de espículas; habitualmente uno o dos pares. Pueden estar formados por la eliminación de un cuerpo de Heinz por la acción de *pitting* o extrusión del bazo (fig. 5.42) o por un daño mecánico (figs. 5.43 y 5.44). A veces se han utilizado los términos «células en casco» y «células en mordisco» para describir a los queratocitos.

Acantocitosis (ἄκανθα, espina)

El término *acantocitosis* se introdujo para describir una anomalía del eritrocito en la que se observa un número pequeño de espículas de longitud, grosor y forma variables, dispuestas irregularmente sobre la superficie de la célula (fig. 5.45). A menudo están asociadas con un metabolismo anómalo de los fosfolípidos[9-11] o con anomalías heredadas en las proteínas de la membrana de los hematíes como en el fenotipo McLeod, causado por la falta del precursor de Kell (Kx)[12]. Se encuentran en cantidades variables tras la esplenectomía y en el hipoesplenismo. Una célula similar se observa en la hepatopatía grave (anemia de «células en espuela»)[13].

Equinocitosis (ἐχῖνος, erizo de mar o puercoespín)

La equinocitosis o crenación describe el proceso por el que los hematíes desarrollan muchas o numerosas proyecciones regulares y cortas en su superficie (v. figs. 5.25 y 5.26). Descrita inicialmente por Ponder[14] como una transformación en disco-esfera, la crenación tiene muchas causas. En muchas extensiones sanguíneas se pueden observar algunas células crenadas, incluso en sujetos sanos. La crenación se desarrolla habitualmente si se deja la sangre a 20 °C durante toda la noche antes de hacer las extensiones (v. fig. 5.26). Puede ser una característica destacada, por oscuras y probablemente diversas razones, en las extensiones sanguíneas hechas con sangre fresca de pacientes que

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

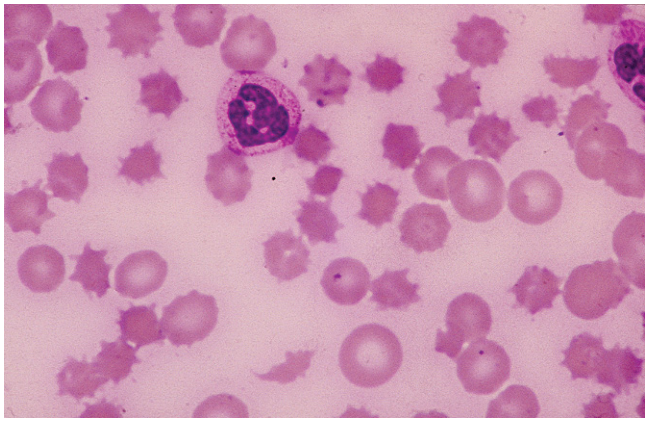


Figura 5.45. Microfotografía de una extensión sanguínea. Insuficiencia hepática. Los acantocitos son evidentes.

presentan diversas enfermedades, sobre todo la uremia. También se ven en las extensiones de pacientes sometidos a circulación extracorpórea. Se ha notificado una equinocitosis marcada en los lactantes prematuros tras la transfusión de recambio o la transfusión de hematíes normales[15]. Cuando la crenación se superpone a una anomalía subyacente, los hematíes pueden tener un aspecto extremadamente raro.

La crenación puede presentarse como un artefacto si los hematíes se separan del plasma y se lavan y suspenden en una solución de NaCl a 9 g/l y posteriormente se depositan entre superficies de vidrio, sobre todo a un pH elevado; también se produce en presencia de trazas de sustancias grasas en los portaobjetos en los que se hacen las extensiones y en presencia de trazas de productos químicos que a concentraciones elevadas causan lisis.

Los estadios finales de la crenación son la «esfera finamente crenada» y la «forma esférica», que recuerdan enormemente a los esferocitos. La transformación en el discoesfera puede ser reversible (p. ej., la producida por el lavado de los hematíes) y, a este respecto, la «forma esférica» contraída (que no ha perdido superficie) es bastante distinta del «esferocito» (que ha perdido superficie), aunque ambos pueden parecerse mucho en las extensiones teñidas.

Si se observa equinocitosis en una extensión, ésta representa por lo general un artefacto de almacenamiento causado por un retraso a la hora de hacer la extensión. Es una advertencia de que las características morfológicas en las extensiones sanguíneas no pueden valorarse con total fiabilidad. Si se encuentran en extensiones hechas con sangre fresca, la observación es clínicamente significativa.

MISCELÁNEA DE ANOMALÍAS DE LOS HEMATÍES

Leptocitosis (λεπτός, delgado)

El término *leptocitosis* se ha utilizado para describir a los hematíes con una delgadez inusual, como en la deficiencia de hierro grave o en la talasemia, en las que las células

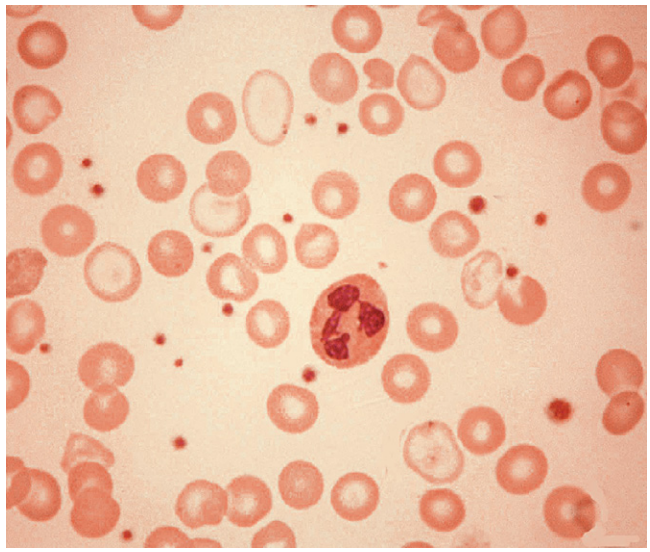


Figura 5.46. Microfotografía de una extensión sanguínea. Talasemia β mayor tras esplenectomía. Muestra una célula diana y células con deficiencia extrema en hemoglobina, que son leptocitos. Hay algunas células transfundidas.

pueden teñirse como anillos de membrana con un poco de hemoglobina fijada y con áreas centrales grandes y casi sin teñir (fig. 5.46).

Células diana

El término *célula diana* hace referencia a una célula en la que se observa un área central redondeada y teñida y un cerco periférico de citoplasma hemoglobinizado separado por un citoplasma sin teñir o con una tinción más ligera. Las células diana se originan de células que tienen una superficie desproporcionadamente grande en comparación con su volumen. Pueden ser normales en tamaño, microcíticas o macrocíticas. Se observan en las extensiones de pacientes con hepatopatías crónicas, en las que las membranas celulares pueden estar cargadas de colesterol

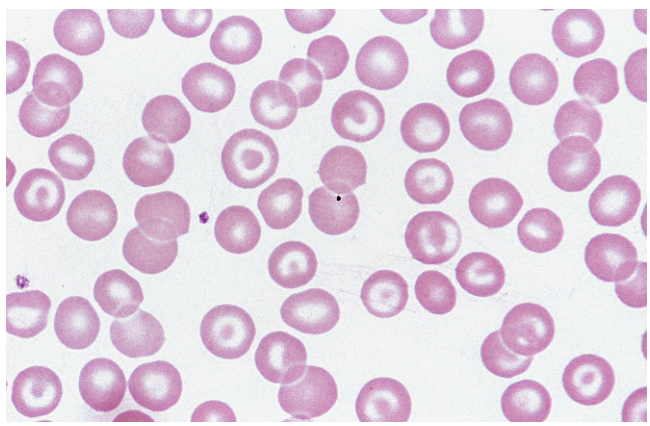


Figura 5.47. Microfotografía de una extensión sanguínea. Hepatopatía alcohólica. Muestra muchas células diana.

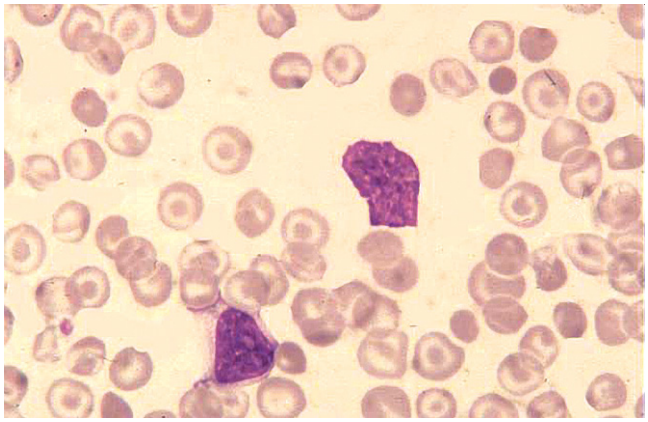


Figura 5.48. Microfotografía de una extensión sanguínea. Heterocigosidad compuesta hemoglobina C/talasemia β°. Se observan células diana, células contraídas de forma irregular y un esferocito.

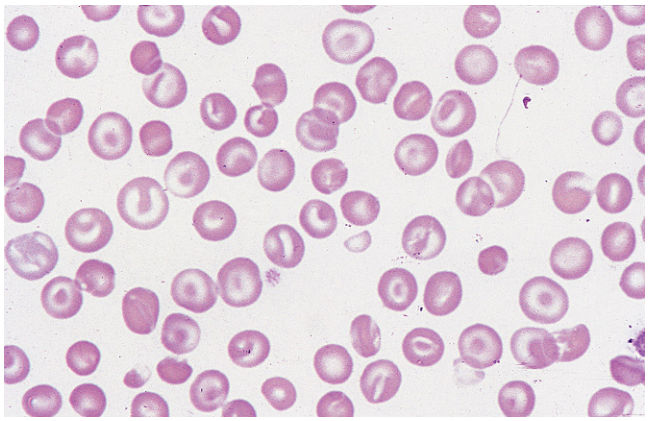


Figura 5.49. Microfotografía de una extensión sanguínea. Homocigosidad para la hemoglobina C. Muestra numerosas células diana y células contraídas de forma irregular.

(fig. 5.47), en la hipobetalipoproteinemia hereditaria[16], y en cantidades variables en la anemia ferropénica y en la talasemia (v. fig. 5.46). A veces son claramente visibles en ciertas hemoglobinopatías (p. ej., hemoglobina C/talasemia β°; fig. 5.48), enfermedad de la hemoglobina C (fig. 5.49), enfermedad de la hemoglobina H (fig. 5.50), anemia de células falciformes, enfermedad de células falciformes/hemoglobina C (fig. 5.51), enfermedad de células falciformes/talasemia β y enfermedad de la hemoglobina E. Las pequeñas cantidades son habituales en el rasgo de la hemoglobina C, el rasgo de la hemoglobina E y la postesplenectomía. La esplenectomía en la talasemia puede causar un grado extremo de formación de leptocitosis y de células diana.

Estomatocitosis (στόμα, boca)

Los estomatocitos son hematíes en los que el área central bicóncava aparece como hendida en las extensiones secas. En las preparaciones «húmedas», el estomatocito es un eritrocito en forma de copa. El aspecto en hendidura de la concavidad celular, como se observa en las extensiones secas, es por tanto en cierta medida un artefacto. El término se utilizó al principio para describir el aspecto de algunas células en un tipo raro de anemia hemolítica con estomatocitosis hereditaria[17]. Son también una característica de la ovalocitosis del sudeste asiático. Se ha descrito que su frecuencia es particularmente elevada en las extensiones sanguíneas de los australianos de origen mediterráneo[18,19]. Posteriormente, los estomatocitos se identificaron en trastornos adquiridos, siendo a veces muy notables (fig. 5.52). Se observan en las hepatopatías, en el alcoholismo[20] y a veces en los síndromes mielodisplásicos. Existe la sospecha de que en algunas extensiones sanguíneas la presencia de estomatocitosis es un artefacto *in vitro* porque se sabe que el cambio puede producirse por un pH reducido y como resultado de la exposición a compuestos del tipo de los detergentes catiónicos y de los aniones no penetrantes[21].

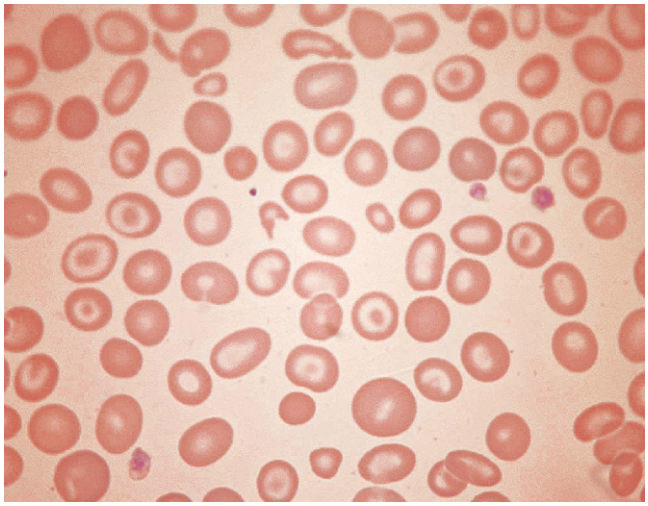


Figura 5.50. Microfotografía de una extensión sanguínea. Enfermedad de la hemoglobina H. Muestra células diana, células hipocrómicas y poiquilocitos.

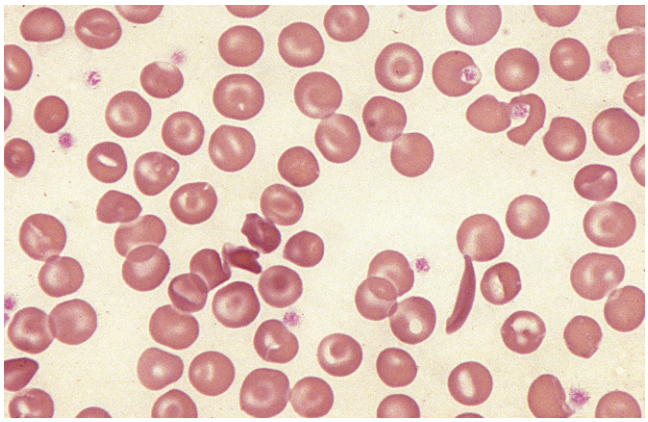


Figura 5.51. Microfotografía de una extensión sanguínea. Enfermedad de células falciformes/hemoglobina C. Muestra una célula falciforme, células diana y dos poiquilocitos SC.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

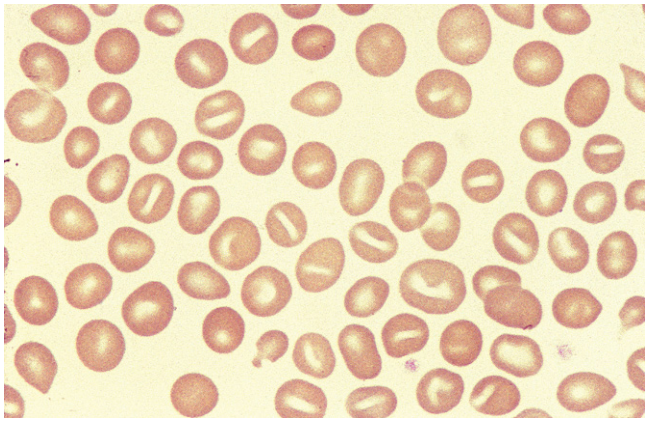


Figura 5.52. **Microfotografía de una extensión sanguínea. Paciente con leucemia mieloide crónica en tratamiento con hidroxicarbamida.** Muestra estomatocitosis. Muchas de las células tienen un área central sin teñir semejante a una hendidura.

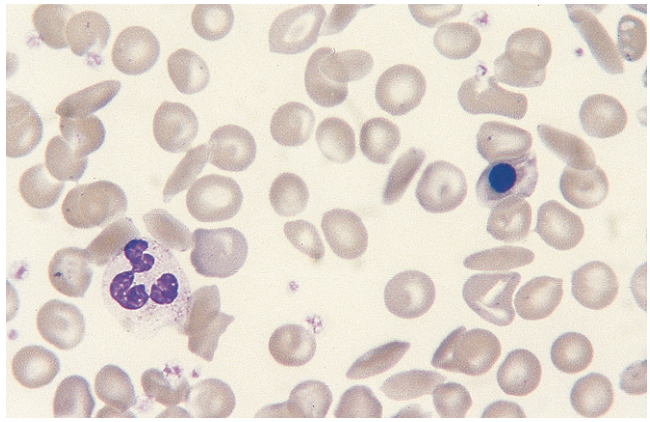


Figura 5.54. **Microfotografía de una extensión sanguínea. Anemia de células falciformes (homocigosidad para la hemoglobina S).** Muestra células en forma de barca y un eritrocito nucleado.

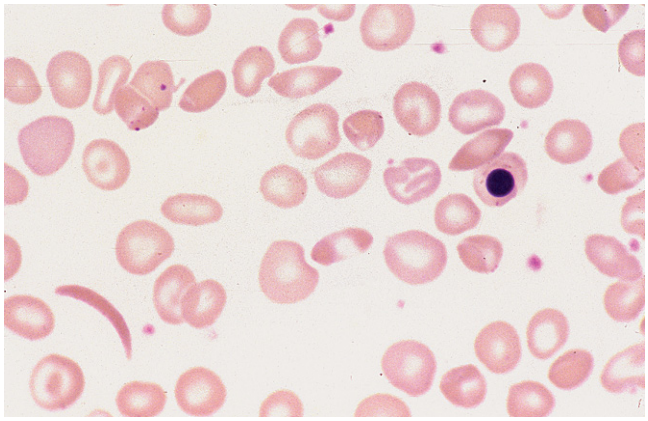


Figura 5.53. **Microfotografía de una extensión sanguínea. Anemia de células falciformes (homocigosidad para la hemoglobina S).** Muestra una célula falciforme, células en forma de barca, un eritrocito nucleado y células diana.

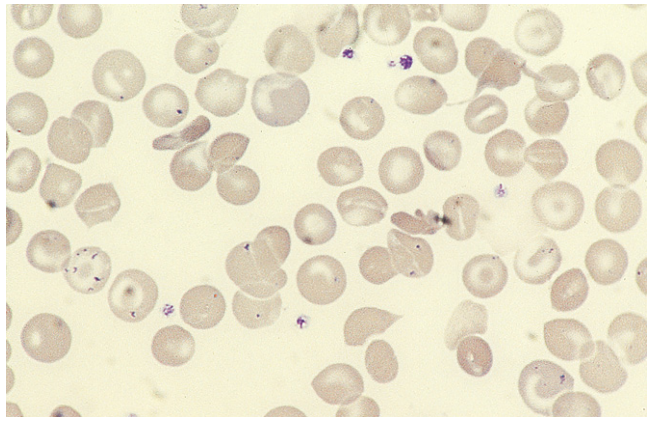


Figura 5.55. **Microfotografía de una extensión sanguínea. Anemia de células falciformes (homocigosidad para la hemoglobina S).** Muestra células falciformes elípticas, células diana y cuerpos de Pappenheimer.

Células falciformes

Los diversos aspectos de las extensiones en la anemia de células falciformes se ilustran en las figuras 5.53, 5.54 y 5.55. Las células falciformes se encuentran de forma prácticamente constante en las extensiones de sangre recién extraída de los adultos homocigotos para la hemoglobina S. Sin embargo, las células falciformes están, por lo general, ausentes en los neonatos y son raras en los pacientes adultos con un porcentaje elevado de hemoglobina F. A veces se encuentran muchas células irreversiblemente falciformes y en todos los casos se produce una deformación masiva cuando la sangre está sujeta a anoxia (v. pág. 251). En las extensiones de sangre fresca, las células falciformes presentan variaciones en su forma, desde las elípticas hasta las que tienen forma de hoz. A menudo, las células diana son también características de las extensiones sanguíneas de los pacientes con anemia de células falciformes y cuando hay atrofia esplénica se encuentran cuerpos de Howell-Jolly.

Poiquilocitos con hemoglobina SC y cristales de hemoglobina C

En pacientes con homocigosidad para la hemoglobina C, las células diana y las células contraídas irregularmente son, por lo general, numerosas y pueden encontrarse cristales de hemoglobina C con el borde recto, ya sea extracelularmente (v. fig. 5.32) o en el fantasma de un eritrocito. En pacientes que son heterocigotos compuestos tanto para la hemoglobina S como para la hemoglobina C, la extensión puede recordar a la de la enfermedad de la hemoglobina C (v. fig. 5.32). En otros pacientes, hay células elípticas, escasas células falciformes y algunas veces poiquilocitos SC característicos (fig. 5.56).

Inclusiones eritrocitarias

Ya hemos mencionado la posibilidad de sospechar a veces la presencia de cuerpos de Heinz en una extensión teñida

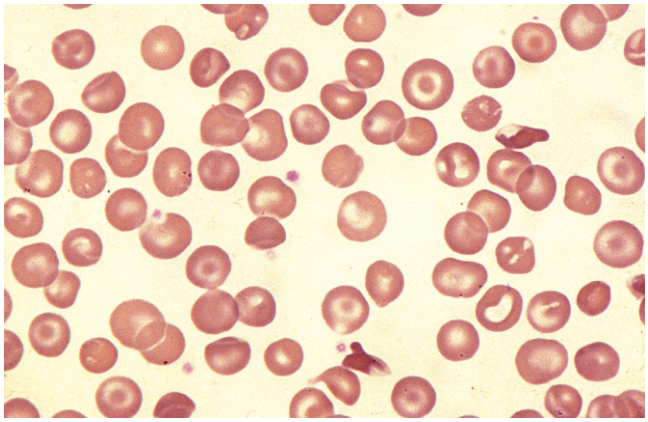


Figura 5.56. Microfotografía de una extensión sanguínea. Enfermedad de células falciformes/hemoglobina C. Se observan poiquilocitos SC y células diana.

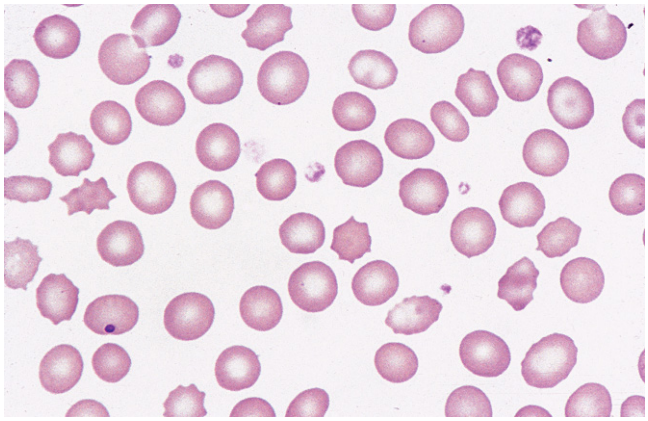


Figura 5.57. Microfotografía de una extensión sanguínea. Postesplenectomía. Muestra acantocitos, una célula diana y un cuerpo de Howell-Jolly.

de forma rutinaria y la detección de cristales de hemoglobina en el interior de los hematíes. Otras inclusiones eritrocitarias son los cuerpos de Howell-Jolly y los de Pappenheimer.

Cuerpos de Howell-Jolly

Son vestigios nucleares y pueden observarse (habitualmente aislados) en un pequeño porcentaje de hematíes en la anemia perniciosa. Las células que los contienen aparecen habitualmente tras la esplenectomía y cuando se ha producido una atrofia esplénica (fig. 5.57). En general, sólo se encuentran unas cuantas células de este tipo, pero pueden ser muy numerosas en los casos de enfermedad celíaca, en la que hay una atrofia esplénica y una deficiencia de folato concomitante.

Cuerpos de Pappenheimer

Los cuerpos de Pappenheimer son pequeñas inclusiones eritrocitarias basófilas (casi negras) dispuestas periféricamente. Habitualmente, sólo hay una pequeña cantidad en el interior de la célula. Están formados por hemosiderina y su presencia se relaciona con una sobrecarga de hierro y con hipoesplenismo (figs. 5.58 y 5.59). A veces, se encuentran en la mayoría de los hematíes circulantes. Su naturaleza puede confirmarse por medio de una tinción de Perls. Corresponden a los gránulos sideróticos de los siderocitos y nunca se encuentran en grandes cantidades en el interior de las células, como el clásico punteado basófilo. Sin embargo, en una sola célula se pueden encontrar ambos elementos, es decir, el punteado basófilo y los cuerpos de Pappenheimer. Con la tinción de Perls, los primeros de estos gránulos se tiñen de rosa mientras que los últimos lo hacen de azul.

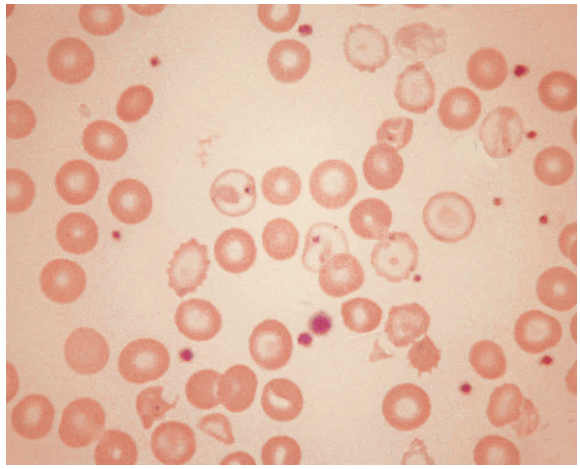


Figura 5.58. Microfotografía de una extensión sanguínea. Talasemia β mayor en un paciente que recibía transfusiones sanguíneas regulares. Se observan cuerpos de Pappenheimer en diversas células escasamente hemoglobinizadas.

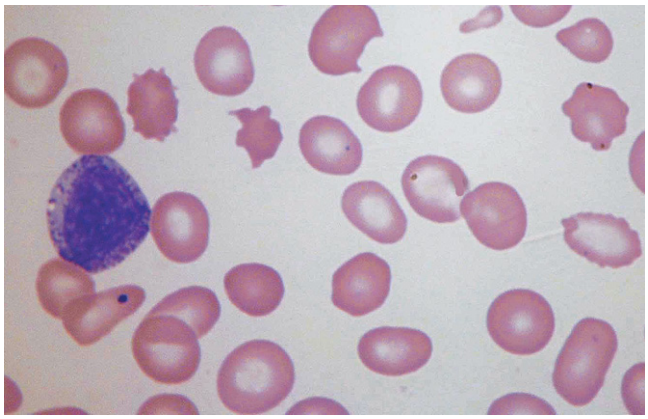


Figura 5.59. Microfotografía de una extensión sanguínea. Púrpura trombocitopénica autoinmunitaria postesplenectomía. Se observa un cuerpo de Pappenheimer y un cuerpo de Howell-Jolly.

Formación de *rouleaux* y autoaglutinación

Las diferencias entre los *rouleaux* y la aglutinación se describen en la página 58 y, por lo general, no es difícil deter-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

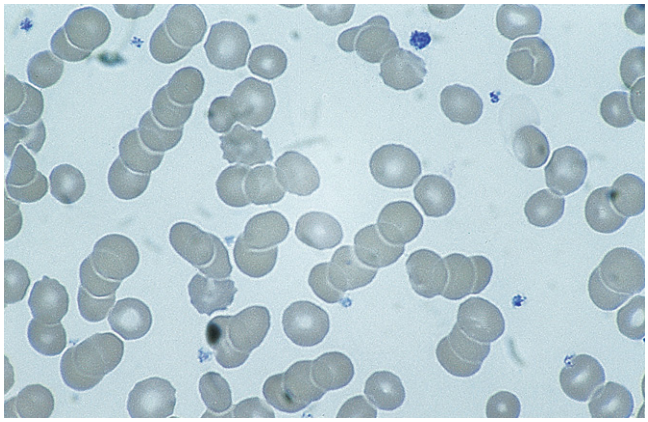


Figura 5.60. **Microfotografía de una extensión sanguínea.** Formación aumentada de cilindros en un paciente con infección bacteriana.

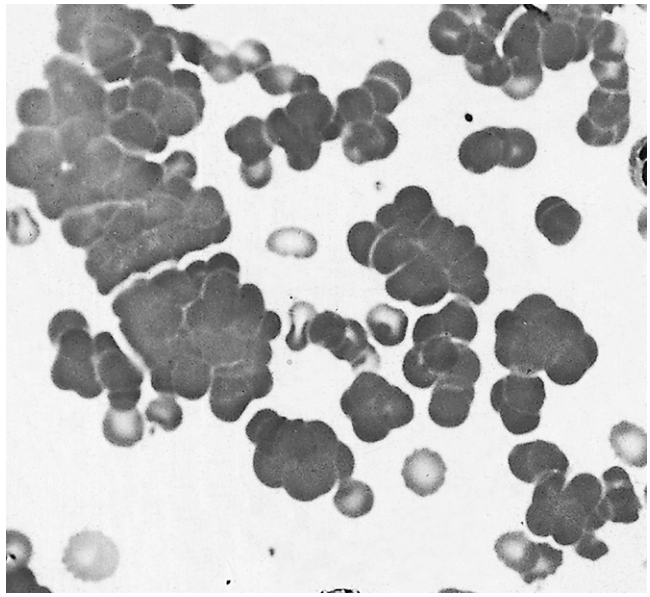


Figura 5.61. **Microfotografía de una extensión sanguínea.** Muestra una masiva autoaglutinación en un paciente con enfermedad por hemaglutinina fría crónica (compárese con la fig. 5.60).

minar cuál es cuál en las extensiones teñidas (figs. 5.60 y 5.61). Sin embargo, en el mieloma múltiple y en otros trastornos en los que hay una gran formación de *rouleaux*, éstos pueden tener un aspecto similar al de la autoaglutinación. Incluso así, si la extensión, que muestra en apariencia una autoaglutinación, se examina cuidadosamente, se encontrará, casi con certeza, una zona en la que se puede observar con claridad la formación de *rouleaux*. Este fenómeno se produce hasta cierto punto en todas las extensiones y su presencia subraya, como hemos mencionado, la importancia de seleccionar cuidadosamente el área que se va a examinar.

CAMBIOS RELACIONADOS CON UN AUMENTO COMPENSADOR DE LA ERITROPOYESIS

Policromasia (πολύς, muchos)

El término *policromasia* sugiere que los hematíes se tiñen de muchos colores. En la práctica, quiere decir que algunos de los hematíes se tiñen con distintos grados de un gris azulado (fig. 5.62): son los reticulocitos. Las células que se tiñen con un azul degradado, «policromasia azul», son reticulocitos inusualmente jóvenes. La «policromasia azul» se ve más a menudo cuando hay una intensa actividad eritropoyética o cuando hay una eritropoyesis extramedular, como, por ejemplo, en la mielofibrosis o en la carcinomatosis.

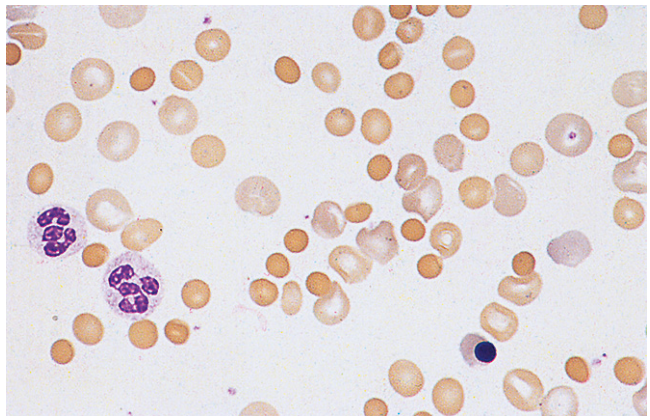


Figura 5.62. **Microfotografía de una extensión sanguínea.** **Policromasia.** Algunos hematíes se tiñen con un gris azulado degradado.

Eritroblastosis

Los eritroblastos se pueden encontrar en las extensiones sanguíneas de casi cualquier paciente con una anemia grave; sin embargo, son muy poco habituales en la anemia aplásica y su presencia debe hacer dudar de este diagnóstico. Aparecen con más frecuencia en los niños que en los adultos y, en grandes cantidades, representan un hallazgo muy característico de la enfermedad hemolítica del recién nacido. Se pueden hallar en pequeña cantidad en la sangre del cordón umbilical de los recién nacidos normales, mientras que en la de los prematuros se hallan en cantidades importantes.

Cuando los eritroblastos están presentes en grandes cantidades, es probable que muchos de ellos deriven de focos eritropoyéticos extramedulares (p. ej., del hígado y del bazo). Esto parece ser cierto, por ejemplo, en la enfermedad hemolítica del recién nacido, las leucemias, la mielofibrosis y la carcinomatosis. En la mielofibrosis y en la carcinomatosis, la cantidad de eritroblastos es a menudo desproporcionadamente alta para el grado de anemia, observándose también unos cuantos granulocitos inmaduros (es la, así denominada, anemia leucoeritroblástica) (fig. 5.63).

Los eritroblastos pueden encontrarse, generalmente, en la sangre periférica tras una esplenectomía y ser muy nu-

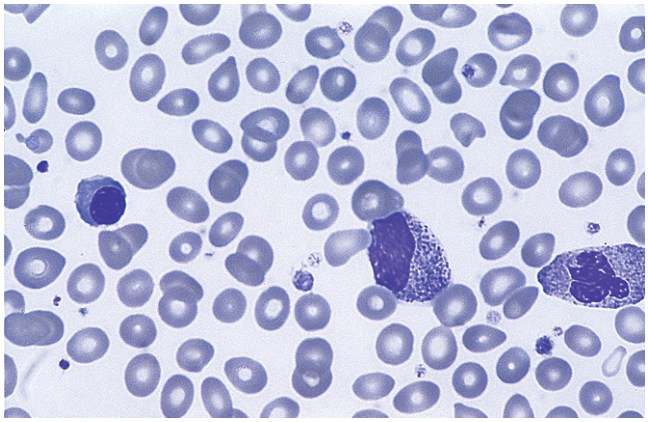


Figura 5.63. Microfotografía de una extensión sanguínea. Mielofibrosis idiopática. Muestra una extensión sanguínea con reacción leucoeritroblástica, poiquilocitos en lágrima y ovalocitos.

merosos en la anemia grave y en presencia de una eritropoyesis extramedular (fig. 5.64). Frecuentemente se observan grandes cantidades en las extensiones sanguíneas de los pacientes con anemia de células falciformes en las crisis dolorosas. No es raro encontrar pequeñas cantidades de eritroblastos en la sangre de pacientes con insuficiencia cardíaca cianótica o con septicemia.

Hay que indicar que cuando se utiliza el término *normoblasto*, ello implica que la maduración eritroidea es normoblástica. *Eritroblasto* es un término más general que incluye también a los megaloblastos.

EFECTOS DE LA ESPLENECTOMÍA Y DEL HIPOESPLENISMO

Ya se han mencionado algunos de los efectos de la esplenectomía y del hipoesplenismo; sobre todo, la presencia de células diana, de acantocitos, de cuerpos de Howell-Jolly y de cuerpos de Pappenheimer (v. fig. 5.57). Además, puede haber neutrofilia (precozmente tras la esplenectomía), linfocitosis, trombocitosis y plaquetas gigantes. En las personas hematológicamente normales, las características del hipoesplenismo en la extensión sanguínea son variables: algunas veces llamativas y otras poco relevantes.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

La morfología de los hematíes, como se ilustra en este capítulo, puede distorsionarse al extender y secar las extensiones de la forma tradicional. Un retrato más real de la forma de los hematíes *in vivo* puede observarse con la microscopia electrónica de barrido. Ésta nos aporta los medios para un reexamen crítico de la morfología eritrocitaria. Bessis y sus colaboradores han publicado fotografías excelentes de los hematíes patológicos y propuesto, a partir de su aspecto, una terminología[7,21,22] que hemos adoptado en general en este capítulo. También han analizado la difícil cuestión de la importancia *in vivo* de la crenación

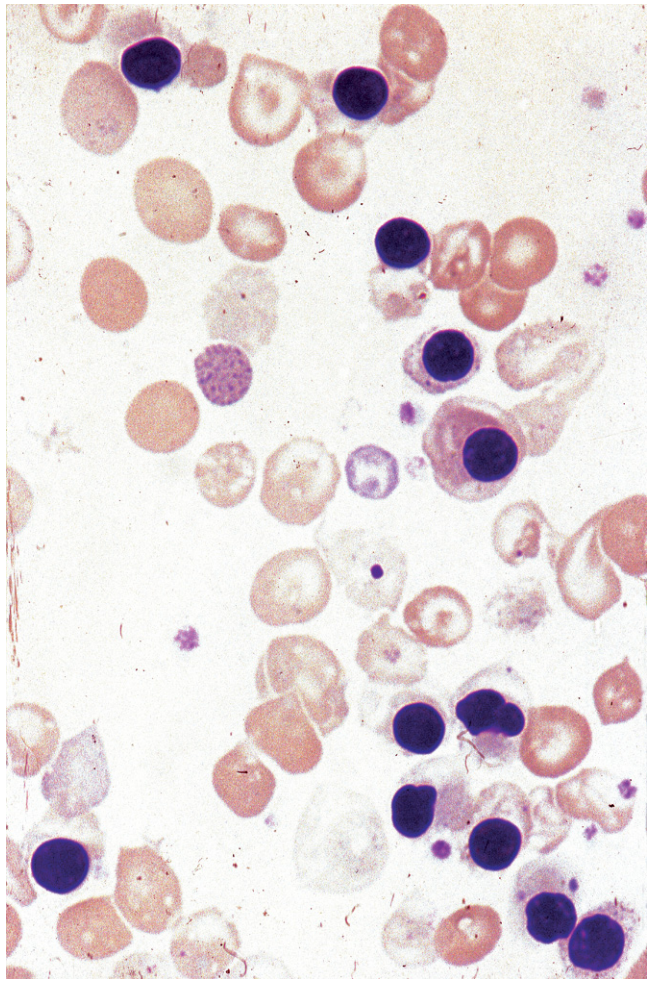


Figura 5.64. Microfotografía de una extensión sanguínea. Talasemia β mayor con soporte transfusional inadecuado. Se observan muchos eritroblastos; hay también células hipocrómicas, células diana y una célula que contiene un cuerpo de Howell-Jolly.

(cambio equinocítico) observada *in vitro*. Parece ser que ni la equinocitosis ni la acantocitosis se asocian necesariamente con un aumento de la hemólisis. Tampoco puede concluirse que la crenación se produzca *in vivo*, cuando el fenómeno es notablemente evidente en las extensiones realizadas en portaobjetos de cristal. Para garantizar que las células están crenadas en una muestra sanguínea cuando se realiza la extracción, Brecher y Bessis recomiendan que la sangre se examine inmediatamente entre portaobjetos y cubreobjetos de plástico, en lugar de cristal, para evitar el conocido efecto «equinocitogénico» de las superficies de cristal, causado probablemente por la alcalinidad[22]. Sin embargo, con fines prácticos, si una extensión sanguínea de una muestra recientemente extraída muestra equinocitosis y otras extensiones, preparadas utilizando los mismos portaobjetos de vidrio, no lo hacen, la anomalía se puede aceptar como auténtica.

El procedimiento especializado de la microscopia electrónica de barrido no es práctico para utilizarse de forma rutinaria, pero ayuda a comprender la naturaleza de las cé-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

lulas observadas en las extensiones sanguíneas teñidas. Los cambios morfológicos en los hematíes pueden ser muy complejos. Los cambios equinocítico y estomatocítico pueden superponerse en otras formas patológicas, dando lugar a los «estomatocitos falciformes» y a los «estomatoacantocitos». Los acantocitos pueden sufrir una crenación, denominándose el producto «acantoequinocito». Tras la esplenectomía de los pacientes con esferocitosis hereditaria, se pueden observar esferoacantocitos.

El aspecto de diversas de estas células observadas con microscopia electrónica de barrido se ilustra en las figuras 5.65 a 5.72.

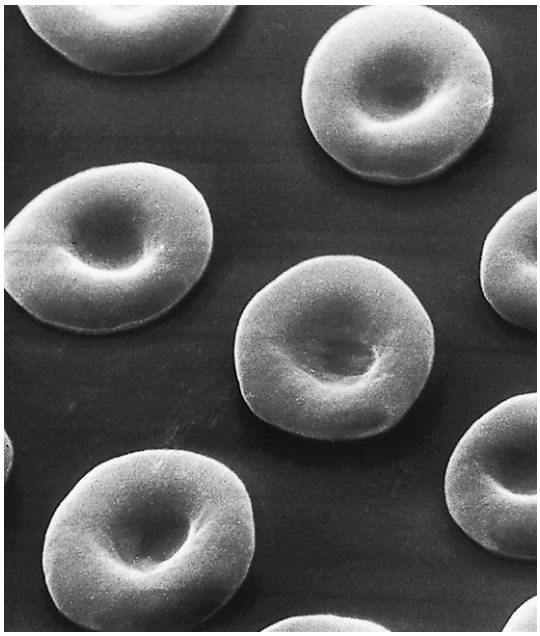


Figura 5.65. **Fotografía de una microscopia electrónica de barrido. Hematíes normales.**

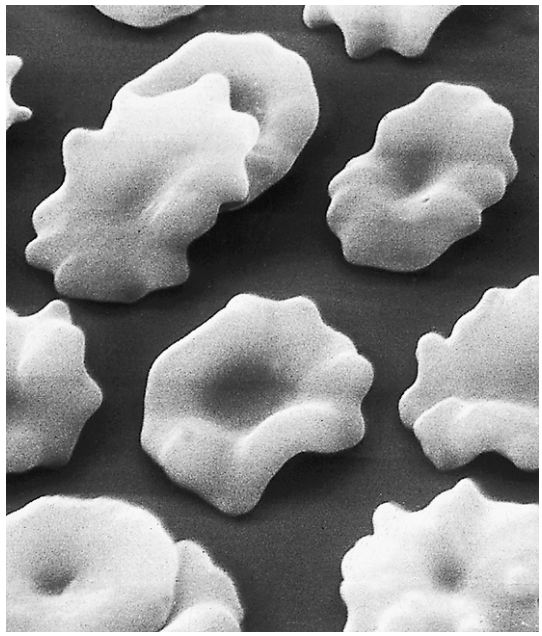


Figura 5.67. **Fotografía de una microscopia electrónica de barrido. Sangre normal dejada toda la noche.** Obsérvese la crenación.

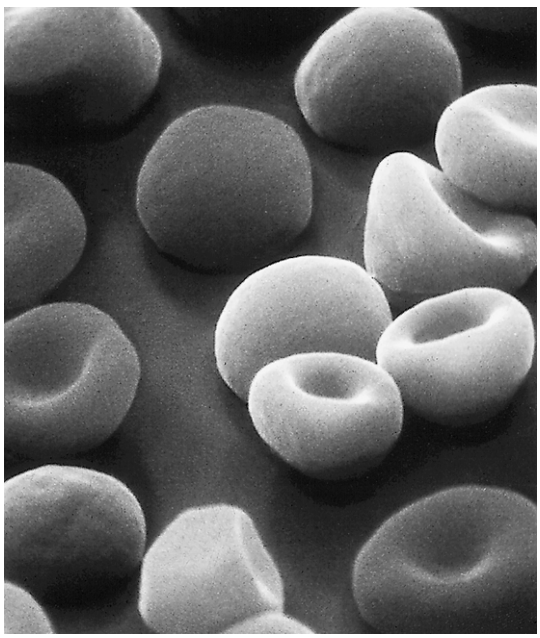


Figura 5.66. **Fotografía de una microscopia electrónica de barrido. Esferocitosis hereditaria.** Obsérvese la forma redonda de los esferocitos. (Compárese con la fig. 5.65; v. también el aspecto de la extensión mostrado en la fig. 5.21.)

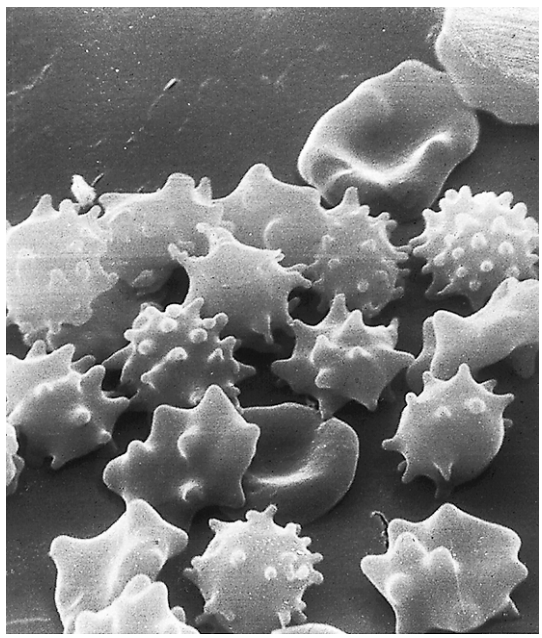


Figura 5.68. **Fotografía de una microscopia electrónica de barrido. Acantocitosis.** Algunas células muestran también crenación y contracción. (Compárese con la fig. 5.67; v. también el aspecto de la extensión mostrado en la fig. 5.45.)

MORFOLOGÍA DE LOS LEUCOCITOS

Esta sección incluye una descripción de los leucocitos normales, algunas anomalías congénitas y los cambios reactivos que se encuentran habitualmente. La descripción adecuada de los diversos cambios que se observan en los trastornos malignos requeriría un texto extenso y muchas ilustraciones que están más allá del ámbito de este libro. Nos referiremos a ellas brevemente, pero para encontrar mayores detalles los lectores deben consultar un atlas de células sanguíneas. Para la clasificación de las leucemias agudas, véase la descripción original del grupo FAB (Francés-Americano-Británico)[23] y la revisión posterior[24]. Existe

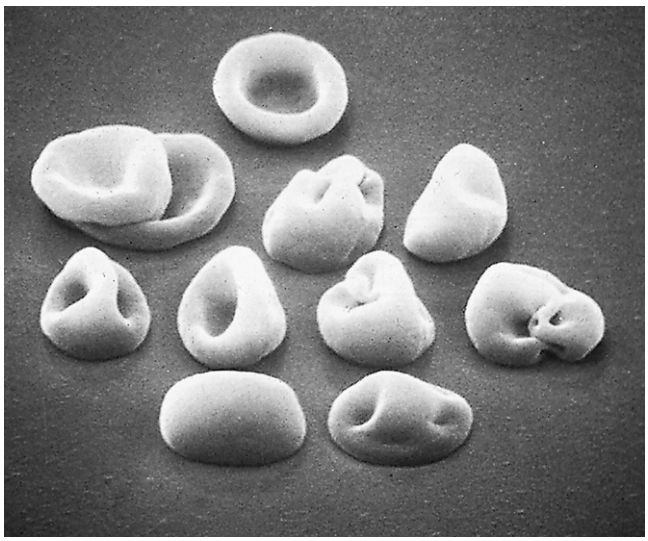


Figura 5.69. Fotografía de una microscopia electrónica de barrido. Hemólisis inducida por fármacos. Véase el aspecto de la extensión sanguínea mostrado en la figura 5.43.

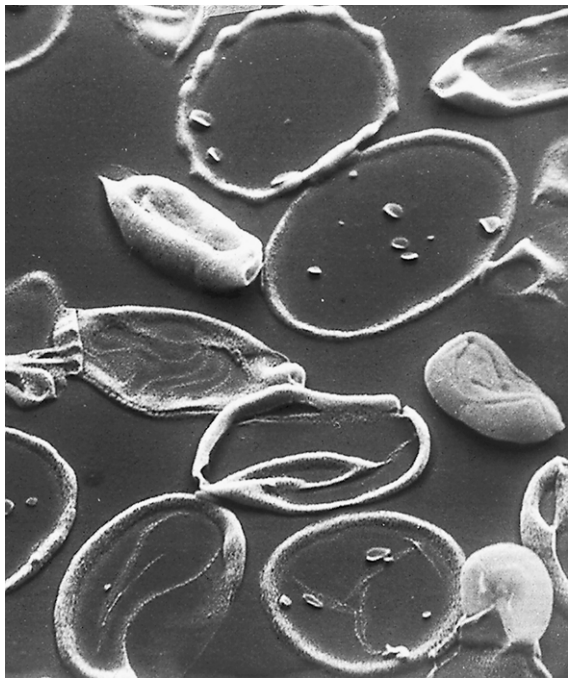


Figura 5.71. Fotografía de una microscopia electrónica de barrido. Anemia de células falciformes (homocigosidad para la hemoglobina S). Muestra las células falciformes.

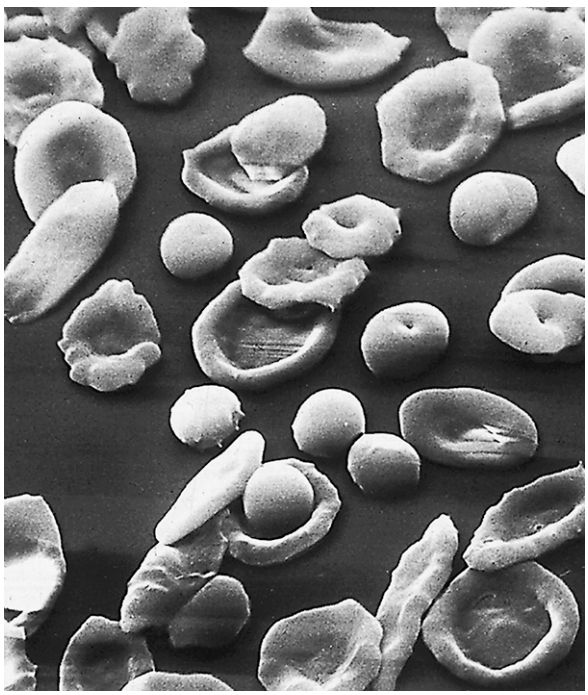


Figura 5.70. Fotografía de una microscopia electrónica de barrido. Anemia ferropénica. (Compárese con la fig. 5.71 y v. también la fig. 5.12.)

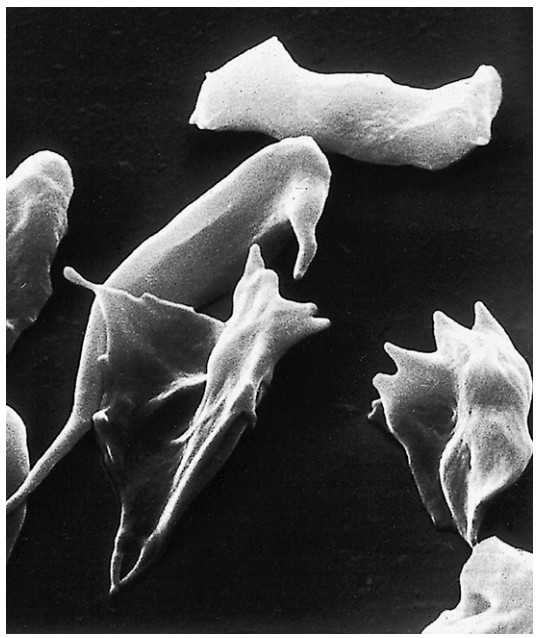


Figura 5.72. Fotografía de una microscopia electrónica de barrido. Talasemia β mayor postesplenectomía. Muestra células con deficiencia extrema de hemoglobina; también hay células contraídas y poiquilocitos. En las células hipocrómicas se observan inclusiones que corresponden a cuerpos de Pappenheimer.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

también una clasificación de la Organización Mundial de la Salud[25] que reemplaza a las clasificaciones de la FAB cuando existen equipos adecuados para caracterizar completamente las leucemias. No obstante, la clasificación FAB mantiene su utilidad como esquema ampliamente aceptado para la descripción morfológica de las leucemias.

NEUTRÓFILOS POLIMORFONUCLEARES

En los adultos normales, los neutrófilos representan más de la mitad de los leucocitos circulantes. Son la principal defensa del organismo contra las infecciones bacterianas piogénas. Los neutrófilos normales tienen un tamaño uniforme, con un diámetro aparente de *alrededor* de 13 μm en una extensión. Tienen un núcleo segmentado y un citoplasma rosa/naranja, con la tinción, con un granulado fino (fig. 5.73). La mayoría de los neutrófilos tienen tres segmentos nucleares (lóbulos) conectados por hebras de cromatina ahusadas. La cromatina muestra aglomeraciones y está normalmente en la periferia nuclear, donde se condensa. Un porcentaje pequeño presenta cuatro lóbulos y, a veces, se observan cinco lóbulos. Hasta un 8% de los neutrófilos circulantes no están segmentados o sólo lo están parcialmente (formas «en banda») (analizadas más adelante).

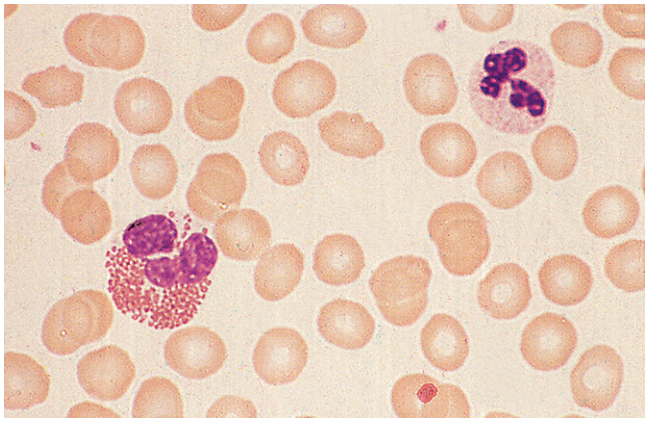


Figura 5.73. Microfotografía de una extensión sanguínea. Neutrófilo polimorfonuclear normal y eosinófilo normal.

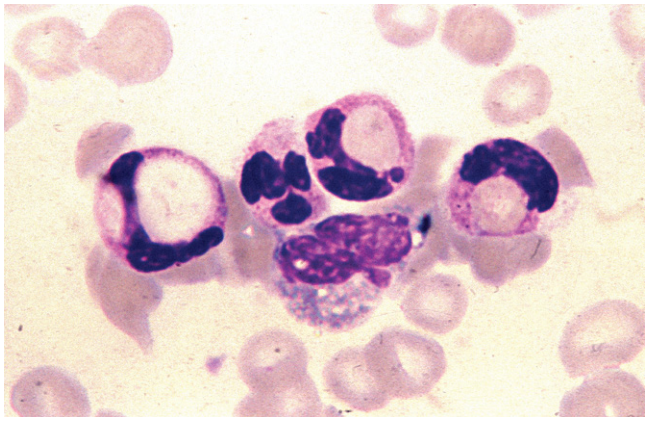


Figura 5.74. Microfotografía de una extensión sanguínea. Eritrofagocitosis en un paciente con prueba directa de la antiglobulina positiva.

En las mujeres, el 2-3% de los neutrófilos muestran un apéndice en un segmento nuclear terminal. Este «palillo de tambor» tiene cerca de 1,5 μm de diámetro y está conectado al núcleo por un corto pedúnculo. Representa al cromosoma X inactivo y corresponde al cuerpo de Barr de las células bucales.

En ocasiones, los hematíes se adhieren a los neutrófilos formando rosetas. El mecanismo no se conoce, pero es probable que sea inmunitario; en general no parece tener importancia clínica pero, a veces, se observa en la anemia hemolítica inmunitaria. La leucoaglutinación también se produce como un artefacto *in vitro*[26]. En ocasiones, los neutrófilos (y/o los monocitos) fagocitan a los hematíes (fig. 5.74). Este hecho es particularmente habitual en la hemoglobinuria paroxística por frío.

Es extremadamente importante garantizar la consistencia de la tinción en las extensiones sanguíneas utilizando un método de Romanowsky estandarizado (v. cap. 4) porque los cambios en la densidad de la tinción, el color y el aspecto de la granulación citoplasmática, si no son artefactos, pueden tener importancia diagnóstica. Las anomalías habituales de los neutrófilos se describen más adelante en este capítulo.

Gránulos

La *granulación tóxica* es el término utilizado para describir el aumento de la densidad de la tinción y posiblemente de la cantidad de gránulos que se produce generalmente en las infecciones bacterianas y, a menudo, en otras causas de inflamación (fig. 5.75). Puede ser también una característica de la administración del factor estimulador de las colonias de granulocitos. En la anemia aplásica y en la mielofibrosis se pueden observar gránulos más

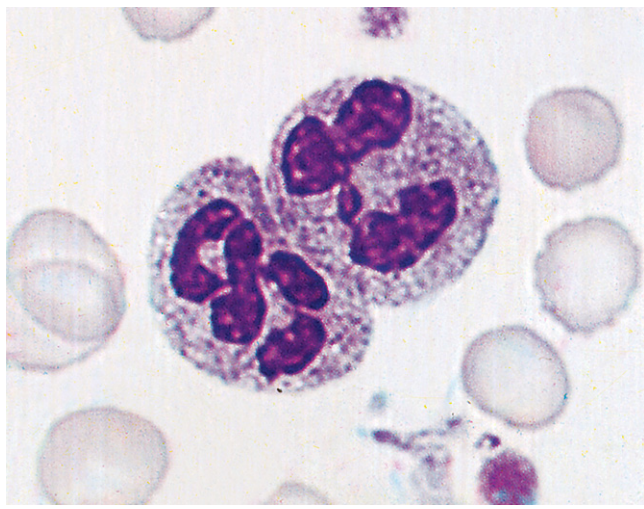


Figura 5.75. Microfotografía de una extensión sanguínea. **Infección grave.** Los neutrófilos muestran granulación tóxica.

toscos y ligeramente mayores. En cambio, se observan neutrófilos agranulares y escasamente teñidos (hipogranulares) en los síndromes mielodisplásicos (fig. 5.76) y en algunas formas de leucemia mieloide.

Hay trastornos hereditarios raros que se manifiestan por medio de neutrófilos anómalos. En la anomalía de Alder-Reilly, los gránulos son muy grandes y bien diferenciados, se tiñen de un rojo intenso y pueden impedir la visión del núcleo (fig. 5.77). Otros leucocitos, incluyendo algunos linfocitos, muestran también gránulos anómalos. En el síndrome de Chediak-Higashi se observan gránulos azurófilos gigantes, aunque escasos (fig. 5.78) y puede haber afectación de los otros tipos leucocitarios. Los neutrófilos de Alder-Reilly funcionan normalmente, pero en el síndrome de Chediak-Higashi hay un defecto funcional que se manifiesta por la susceptibilidad a las infecciones graves.

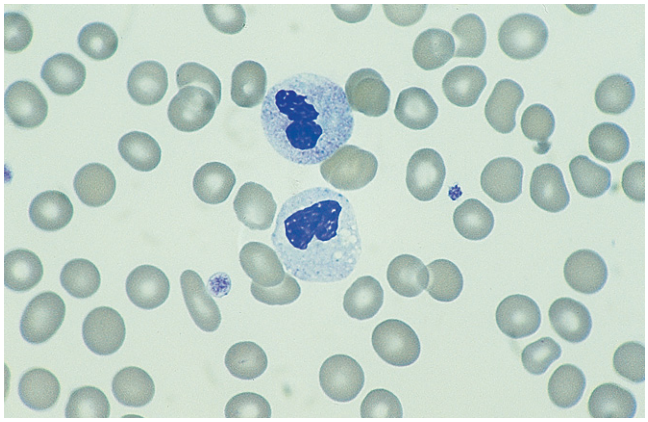


Figura 5.76. Microfotografía de una extensión sanguínea. Síndrome mielodisplásico. Muestra un neutrófilo hipogranular y un neutrófilo con granulación normal.

Vacuolas

En las extensiones sanguíneas realizadas sin demora, la presencia de vacuolas en los neutrófilos suele indicar la existencia de una sepsis grave cuando coexiste con la presencia de granulación tóxica. Las vacuolas aparecerán como artefactos cuando la sangre se ha conservado de forma prolongada antes de realizar la extensión (v. cap. 1, fig. 1.2, pág. 7).

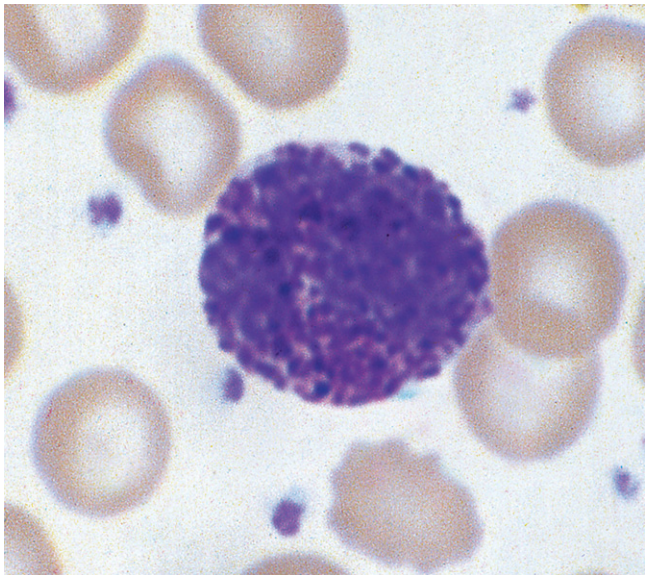


Figura 5.77. Microfotografía de una extensión sanguínea. Anomalía de Alder-Reilly. El núcleo no es visible debido a los gránulos citoplasmáticos.

Bacterias

En muy raras ocasiones, en presencia de una septicemia grave (p. ej., meningocócica o neumocócica), se pueden observar bacterias en el interior de las vacuolas o esparcidas, aparentemente libres, en el citoplasma de los neutrófilos. Cuando se toma sangre de una vía central infectada, se pueden observar cúmulos de bacterias o de hongos dispersos por la extensión así como en las vacuolas fagocitarias de los neutrófilos (fig. 5.79). En los recién nacidos prematuros con septicemia estafilocócica, la detección de bacterias en los neutrófilos ayuda a realizar un diagnóstico precoz[27].

Cuerpos de Döhle

Los cuerpos de Döhle son estructuras pequeñas, redondeadas u ovales y de color gris-azulado que habitualmente se encuentran en la periferia de los neutrófilos. Están formados por ribosomas y retículo endoplásmico. Se observan en las infecciones bacterianas. Existe también un trastorno hereditario benigno conocido como *anomalía de May–Hegglin* con una estructura morfológica similar aunque no idéntica; en este trastorno, las inclusiones se presentan en todos los tipos de leucocitos, a excepción de los linfocitos.

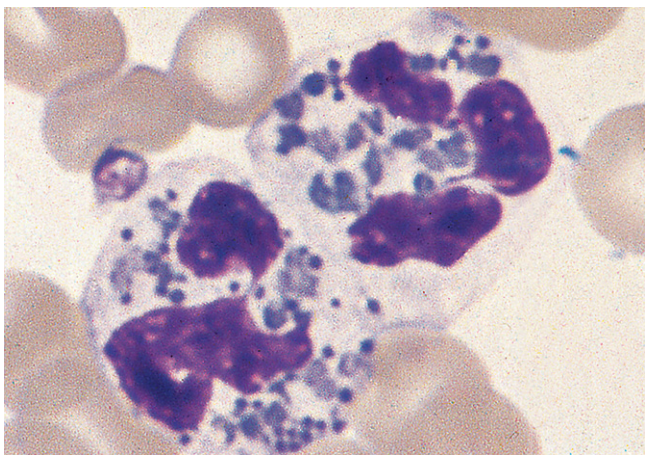


Figura 5.78. Microfotografía de una extensión sanguínea. Síndrome de Chediak-Higashi. Los neutrófilos muestran gránulos anómalos.

Núcleos

La segmentación del núcleo de los neutrófilos es un suceso normal a medida que la célula madura a partir del mieloci-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

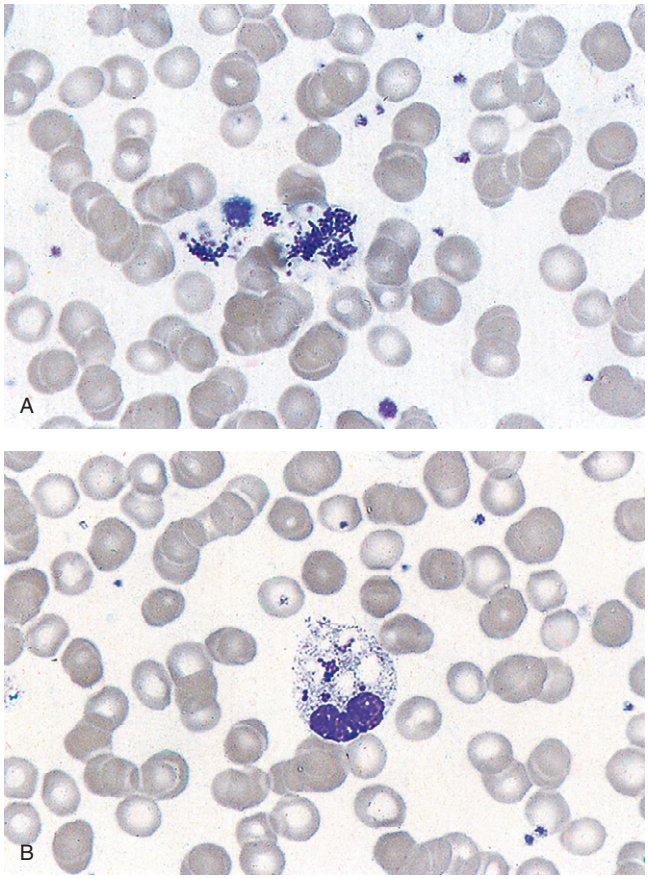
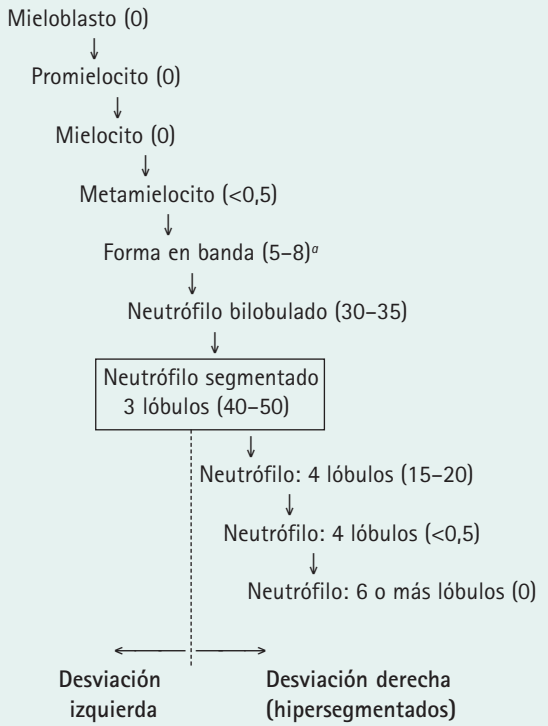


Figura 5.79. Microfotografía de una extensión sanguínea. Sangre recogida de un sitio infectado. Se observan bacterias (A) en cúmulos dispersos y en un neutrófilo (B).

Tabla 5.1. Etapas de la maduración de los granulocitos



Las cifras entre paréntesis dan una indicación aproximada de la cantidad por 100 neutrófilos en una extensión normal. Se indican únicamente como una guía aproximada.
[a] Sin embargo, según las encuestas de la United States Health and Nutrition Examination, el recuento normal de la forma en banda es inferior: alrededor del 0,5% de los neutrófilos[37].

to. Utilizando los neutrófilos de tres lóbulos como marcador, se puede reconocer una desviación a la izquierda (menos madurez) o a la derecha (más madurez) (tabla 5.1). La desviación a la izquierda con formas en banda, metamielocitos y quizás mielocitos ocasionales es habitual en la sepsis (fig. 5.80), y se acompaña, en general, de granulación tóxica. Si se encuentran presentes promielocitos y mieloblastos, es probable que se trate de una anemia leucoeritroblástica o de una leucemia (fig. 5.81); en ocasiones se puede observar este cuadro extremo en infecciones muy graves, lo que se denomina una «reacción leucemoide». En el embarazo se produce normalmente una desviación a la izquierda, con un número significativo de formas en banda.

Hipersegmentación

La presencia de neutrófilos hipersegmentados, con cinco o más segmentos nucleares, es una característica diagnóstica importante de las anemias megaloblásticas. En los estados megaloblásticos floridos, los neutrófilos suelen ser grandes y sus núcleos pueden tener seis o más segmentos conectados por puentes de cromatina extremadamente finos (v. fig. 5.10). La desviación a la derecha con neutrófilos moderadamente hipersegmentados puede observarse también en la uremia y, no raramente, en la deficiencia de hierro[28]. Se puede ver la hipersegmentación tras un tratamiento citotóxico, sobre todo con el metotrexato. Los pacientes sometidos a tratamiento con hidroxicarbamida presentan algunas veces neutrófilos marcadamente hipersegmentados.

Células de Pelger-Huët

La anomalía de Pelger-Huët es un trastorno benigno hereditario en el que los núcleos de los neutrófilos no se segmentan de manera adecuada. La mayoría de los neutrófilos circulantes tienen únicamente dos lóbulos diferenciados de igual tamaño conectados por un puente delgado de cromatina (fig. 5.82). La cromatina está toscamente aglomerada y el contenido de los gránulos es normal.

Una anomalía morfológica adquirida similar, conocida como las células seudo-Pelger o la anomalía adquirida de Pelger-Huët, puede observarse en los síndromes mielodisplásicos, en la leucemia mieloide aguda con maduración displásica y, en ocasiones, en la leucemia granulocítica crónica (durante la fase acelerada) (fig. 5.83). En estos trastornos, los neutrófilos son a menudo hipogranulares y tienden a presentar un patrón nuclear notablemente irregular.

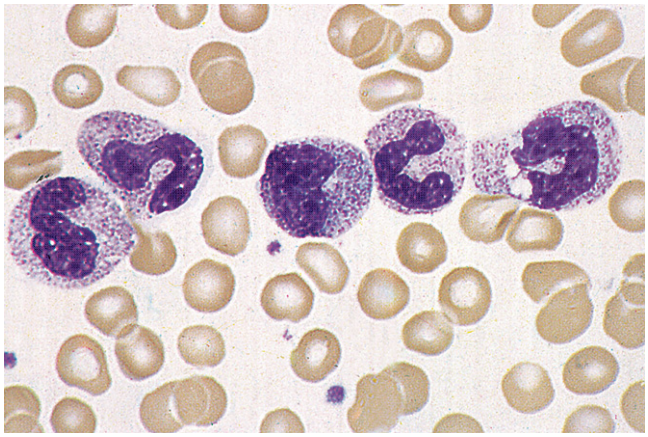


Figura 5.80. Microfotografía de una extensión sanguínea. Muestra desviación a la izquierda de los neutrófilos con granulación tóxica.

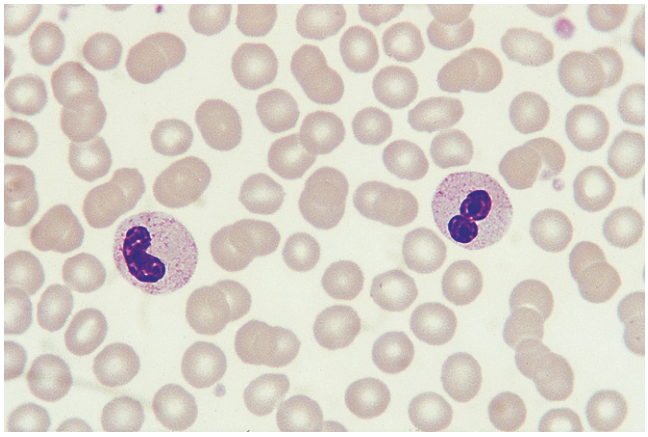


Figura 5.82. Microfotografía de una extensión sanguínea. Anomalía de Pelger-Huët. Muestra neutrófilos hipolobulados.

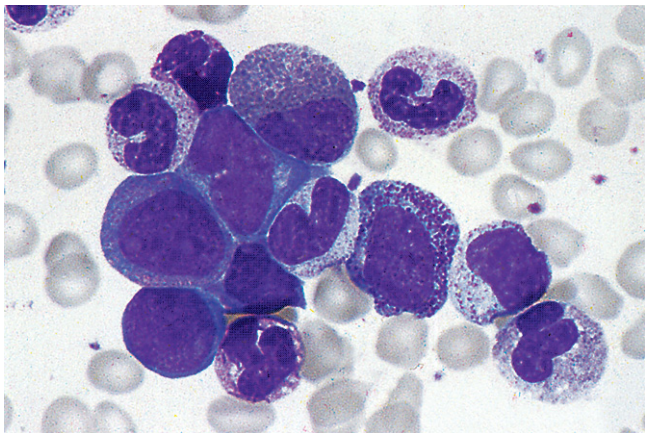


Figura 5.81. Microfotografía de una extensión sanguínea. Leucemia granulocítica crónica. Hay desviación a la izquierda con formas en banda, metamielocitos, mielocitos y un mieloblasto.

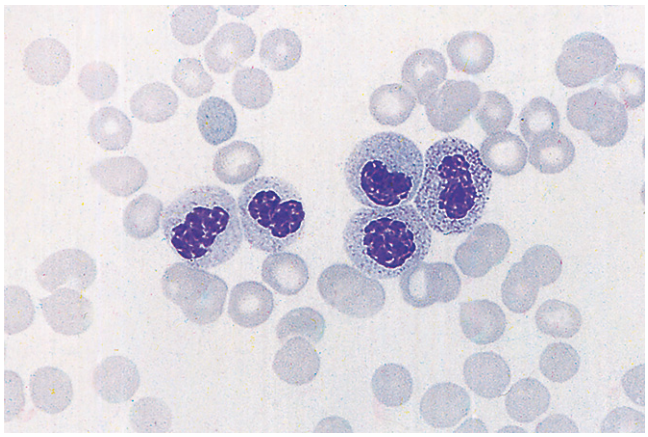


Figura 5.83. Microfotografía de una extensión sanguínea. Leucemia granulocítica crónica. Hay cinco células «seudo-Pelger»; esta anomalía no se observa en la fase crónica de esta enfermedad.

Neutrófilos picnóticos (apoptosis)

Normalmente pueden encontrarse en sangre pequeñas cantidades de células muertas o en proceso de morir, sobre todo si hay una infección. También pueden aparecer en la sangre normal *in vitro* tras permanecer durante 12-18 h, incluso si se mantiene a 4 °C. Estas células tienen núcleos redondos, densos y sin rasgos sobresalientes y su citoplasma tiende a ser rosa oscuro (v. pág. 8 y fig. 1.3). Es importante no confundir estas células con eritroblastos.

EOSINÓFILOS

Los eosinófilos son un poco mayores que los neutrófilos; su diámetro es de 12-17 μm. Habitualmente tienen dos lóbulos o segmentos nucleares y el citoplasma contiene unos gránulos esféricos de color oro/naranja (eosinófilos) característicos (v. figs. 5.73 y 5.84). El citoplasma subyacente, generalmente tapado por los gránulos, es de color azul pálido. La administración prolongada de esteroides causa eosinopenia. En los trastornos alérgicos se produce eosinofilia moderada, mientras que en las infecciones parasitarias puede observarse una eosinofilia más grave (20-50 × 10^9/l); cantidades incluso mayores de eosinófilos aparecen en otras eosinofilias reactivas, en la leucemia eosinofílica y en el síndrome hipereosinófilo idiopático. La eosinofilia reactiva con recuentos muy elevados puede verse en el linfoma de células T, en el linfoma de células B y en la leucemia linfoblástica aguda. Los eosinófilos son parte de la población leucémica en la leucemia granulocítica crónica y, en ocasiones, en la leucemia mieloide aguda.

BASÓFILOS

Los basófilos representan la población menos frecuente (<1%) de los leucocitos circulantes. Sus segmentos nucleares tienden a plegarse uno sobre el otro, resultando un núcleo denso irregular y compacto que recuerda a una flor

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

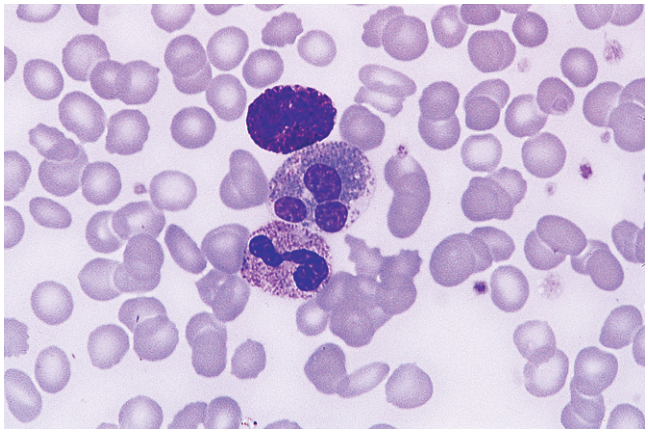


Figura 5.84. Microfotografía de una extensión sanguínea. Adulto normal. Muestra un basófilo, un eosinófilo y un neutrófilo.

de loto cerrada. Los gránulos característicos azul oscuro o púrpura, grandes y de tamaño variable del citoplasma (v. fig. 5.84) a menudo impiden la visión del núcleo; son ricos en histamina, serotonina y heparina. Los basófilos tienden a la degranulación, dejando vacuolas citoplasmáticas.

Los basófilos se encuentran en cantidades crecientes en los trastornos mieloproliferativos y son especialmente visibles en la leucemia granulocítica crónica; en este último trastorno, cuando los basófilos representan más del 10% del recuento leucocitario diferencial, son un signo de la inminencia de una fase acelerada o de una crisis blástica.

MONOCITOS

Los monocitos son los leucocitos circulantes de mayor tamaño: 15-18 mm de diámetro. Tienen un citoplasma gris azulado que contiene cantidades variables de finos gránulos rojizos. El núcleo es grande y curvado, a menudo con la forma de una herradura, pero puede estar plegado o en espiral (figs. 5.85 y 5.86). Nunca está segmentado. La cromatina es más fina y está distribuida más uniformemente que en los núcleos de los neutrófilos. El aumento del número de monocitos se produce en algunas infecciones crónicas y en trastornos inflamatorios como la tuberculosis y la enfermedad de Crohn, en las leucemias mieloides crónicas (sobre todo la leucemia mieloide crónica atípica y la leucemia mielomonocítica crónica) y en las leucemias agudas con un componente monocítico. En la leucemia mielomonocítica crónica, el recuento de monocitos maduros puede alcanzar los 100×10^9/l. En ocasiones, es difícil distinguir los monocitos de los grandes linfocitos T activados, que se producen en la mononucleosis infecciosa, o de las células circulantes en los linfomas de alto grado.

LINFOCITOS

La mayoría de los linfocitos circulantes son células pequeñas con un delgado ribete de citoplasma, que contiene, en

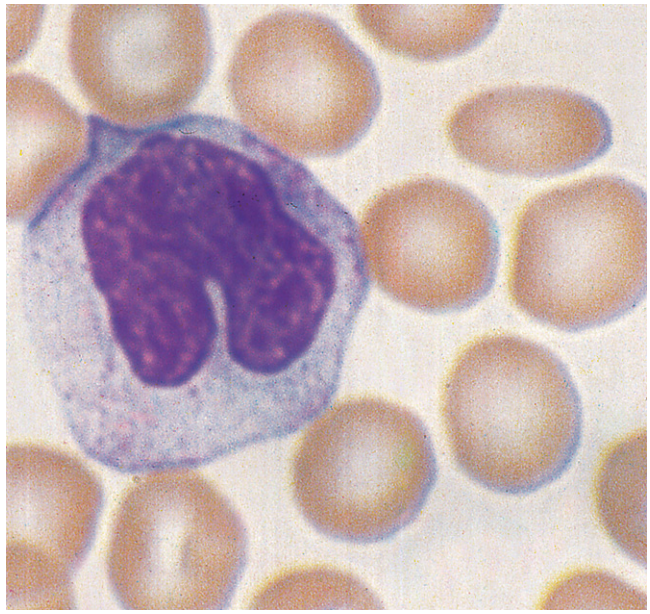


Figura 5.85. Microfotografía de una extensión sanguínea. Adulto sano. Monocito.

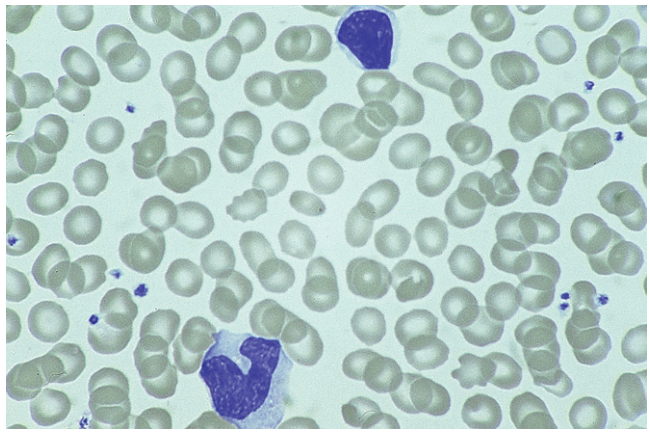


Figura 5.86. Microfotografía de una extensión sanguínea. Adulto sano. Muestra un monocito y un linfocito.

ocasiones, unos pocos gránulos azurófilos (v. figs. 5.1 y 5.87). Los núcleos tienen un tamaño notablemente uniforme (cerca de 9 mm de diámetro). Este tamaño nos proporciona una guía útil para calcular el del eritrocito (alrededor normalmente de 7-8 mm) en la extensión sanguínea. Un 10% de los linfocitos circulantes son mayores, con un citoplasma azul pálido más abundante que contiene gránulos azurófilos (v. fig. 5.87). Los núcleos de los linfocitos tienen una cromatina homogénea con algunas aglomeraciones en la periferia nuclear. Cerca del 85% de los linfocitos circulantes son células T o células asesinas naturales (AN).

Tanto en las infecciones víricas como en las bacterianas pueden encontrarse linfocitos en transformación. Estos inmunoblastos o células de «Türk» tienen de 10 a 15 μm de diámetro, con un núcleo redondo y un citoplasma abundante e intensamente basófilo (fig. 5.88). Pueden convertirse en

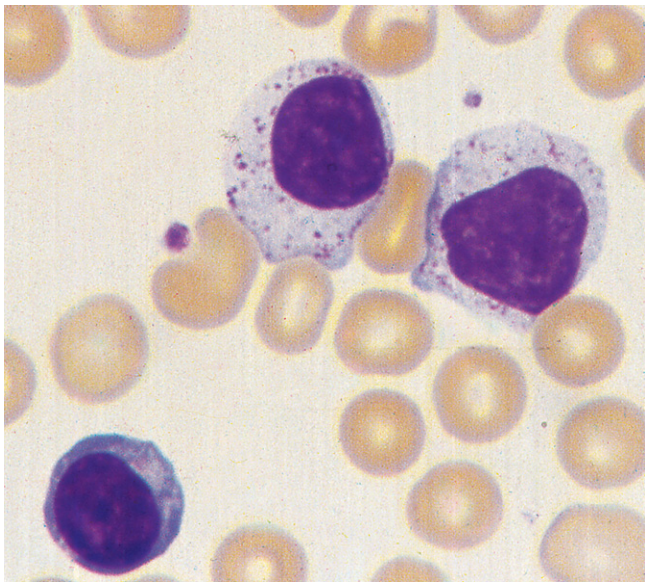


Figura 5.87. Microfotografía de una extensión sanguínea. Muestra un linfocito pequeño y dos linfocitos granulados grandes con gránulos azurófilos.

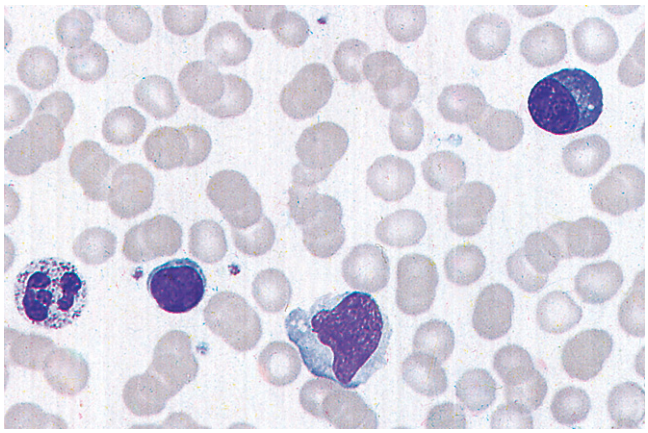


Figura 5.88. Microfotografía de una extensión sanguínea. Infección vírica. Muestra una célula de Türk, otro linfocito reactivo y un linfocito pequeño.

linfocitos plasmocitoides y en células plasmáticas que a veces aparecen en la sangre periférica en las infecciones graves. En ausencia de infección hay que excluir el mieloma múltiple. En la infección vírica, los «linfocitos reactivos» aparecen en la sangre. Éstos tienen un núcleo ligeramente mayor con más cromatina abierta y un citoplasma abundante que puede ser irregular. Los ejemplos más extremos de estas células se encuentran habitualmente en la mononucleosis infecciosa (fig. 5.89). Estas células de la «fiebre glandular» tienen núcleos irregulares y un abundante citoplasma basófilo en la periferia; tienen tendencia a aparecer, en las extensiones sanguíneas, adheridos alrededor de los hematíes adyacentes.

Las células linfoides malignas varían enormemente en su morfología. La neoplasia más habitual es la leucemia linfocítica crónica, en la que la población leucémica se compone

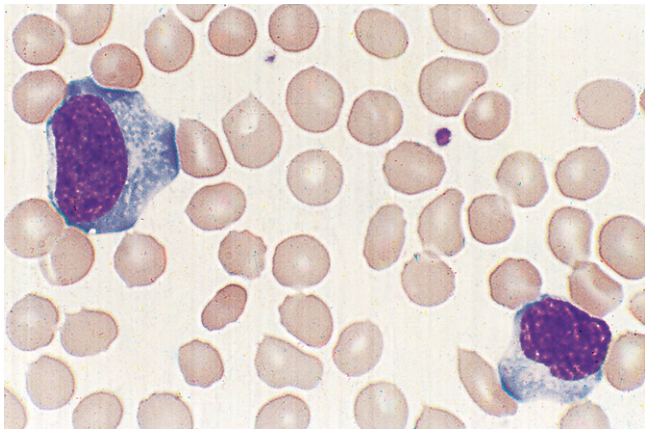


Figura 5.89. Microfotografía de una extensión sanguínea. Mononucleosis infecciosa. Hay dos linfocitos activados («células mononucleares atípicas»).

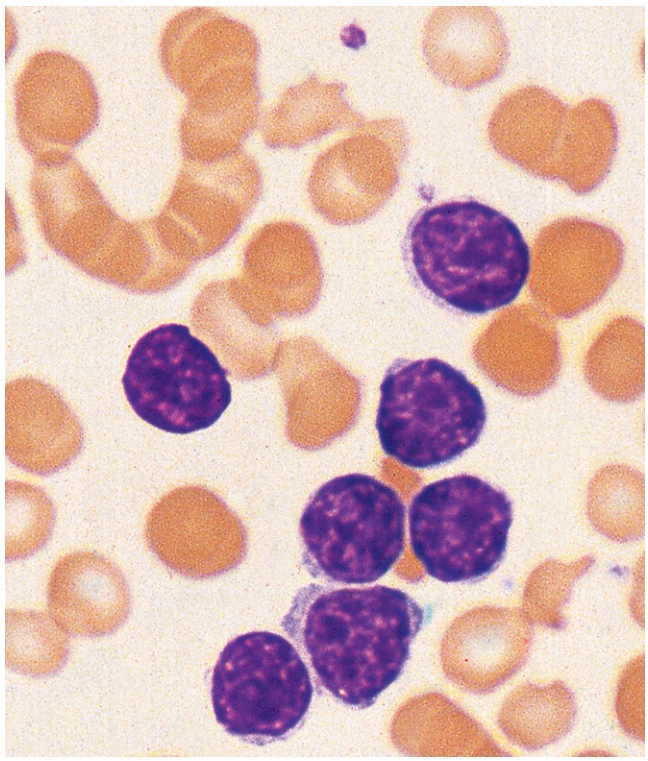


Figura 5.90. Microfotografía de una extensión sanguínea. Leucemia linfocítica crónica. Las células son linfocitos pequeños; obsérvese el aumento en la formación de cilindros.

casi exclusivamente de linfocitos pequeños (fig. 5.90), a veces con unas cuantas células nucleoladas más grandes. En la leucemia prolinfocítica, la mayoría de las células son un poco mayores que los linfocitos pequeños, con más citoplasma y habitualmente un nucléolo diferenciado (fig. 5.91). Los linfoblastos de la leucemia linfoblástica aguda (figs. 5.92 y 5.93) tienen un tamaño variable, desde células ligeramente mayores que los linfocitos a células de 15-17 μm de diámetro. Los núcleos tienen, en general, una cromatina difusa, pero puede haber cierta condensación de la cro-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

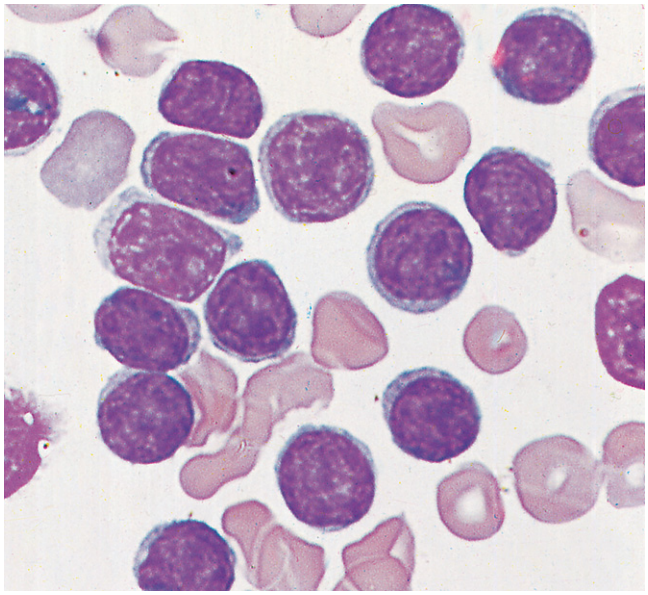


Figura 5.91. Microfotografía de una extensión sanguínea. **Leucemia prolinfocítica.**

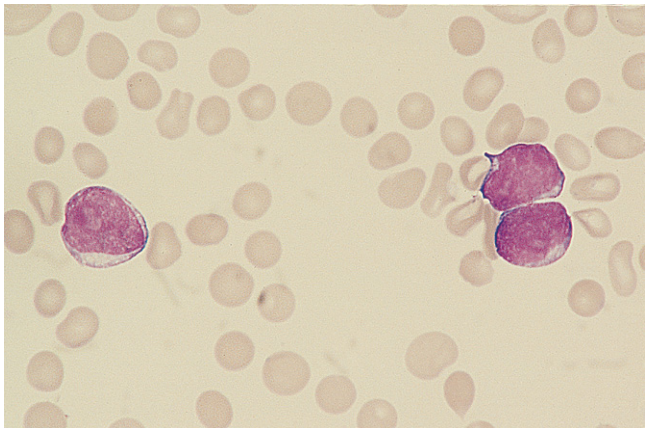


Figura 5.92. Microfotografía de una extensión sanguínea. **Leucemia linfoblástica aguda Philadelphia positiva (categoría FAB L1).** Muestra tes linfoblastos.

matina en los blastos más pequeños. El citoplasma puede mostrar una basofilia débil o intensa. Las células circulantes de los linfomas varían notablemente en su tamaño, dependiendo del tipo de linfoma. Cuando hay una linfocitosis, los linfocitos son habitualmente mucho menos uniformes que en la leucemia linfocítica crónica y las células de los linfomas tienen frecuentemente sus núcleos divididos, indentados o con lóbulos irregulares y un citoplasma agranular relativamente escaso con un grado variable de basofilia. Los linfocitos lobulados son característicos de la infección por el VLTH-I (virus linfotrópico de células T humano tipo I) y de la leucemia/linfoma de células T del adulto. Sin embargo, los linfocitos con una lobulación definida son también un artefacto habitual por almacenamiento de la sangre que se ha conservado durante 18-24 h a temperatura ambiente (v. pág. 6).

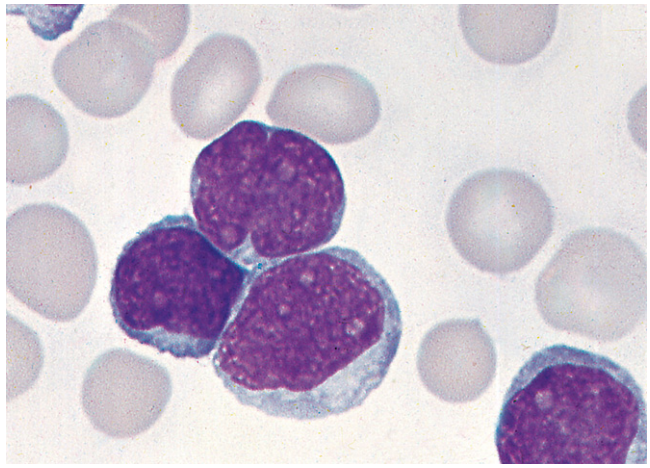


Figura 5.93. Microfotografía de una extensión sanguínea. **Leucemia linfoblástica aguda (tipo FAB L1).** Muestra linfoblastos.

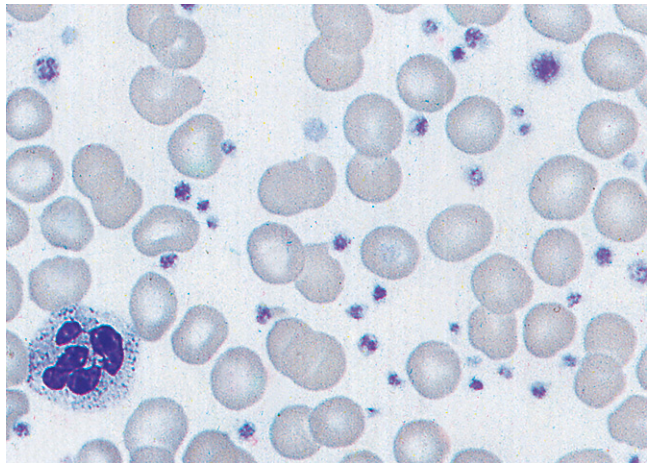


Figura 5.94. Microfotografía de una extensión sanguínea. **Trombocitemia esencial.** Muestra anisocitosis plaquetaria y aumento en el número de plaquetas.

Los linfocitos predominan en las extensiones sanguíneas de los lactantes y de los niños pequeños. En este rango de edad, los linfocitos grandes y los reactivos tienden a destacar, pudiendo encontrarse también un pequeño número de linfoblastos.

MORFOLOGÍA PLAQUETARIA

Las plaquetas normales tienen de 1 a 3 µm de diámetro. Su silueta es irregular, con finos gránulos rojos que pueden estar dispersos o centralizados. En las extensiones normales se puede observar un número pequeño de plaquetas mayores, hasta de 5 µm de diámetro. Las plaquetas mayores se ven en la sangre cuando aumenta la producción plaquetaria (fig. 5.94) y en el hipoesplenismo (fig. 5.95). Así, por ejemplo, en la trombocitopenia inmunitaria grave, se encontrarán algunas plaquetas grandes en la extensión. Los recuentos plaquetarios muy elevados, característicos de

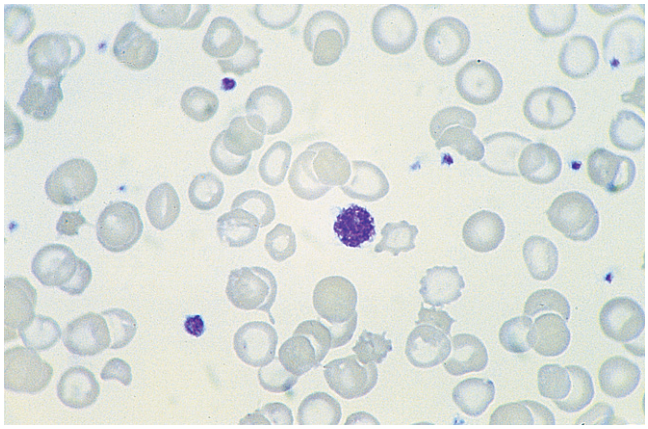


Figura 5.95. Microfotografía de una extensión sanguínea. Hipoesplenismo en la enfermedad celíaca. Muestra una plaqueta gigante.

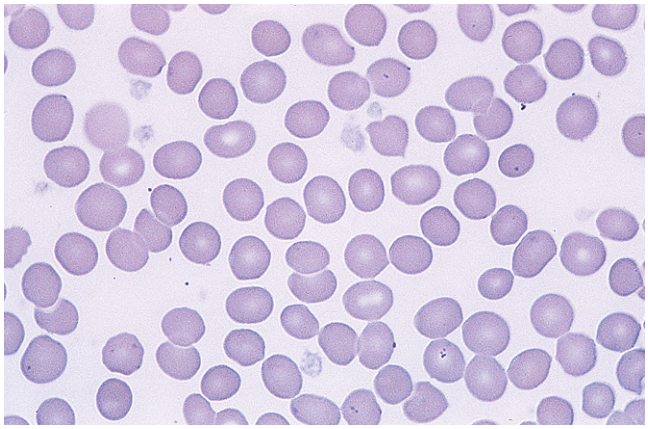


Figura 5.97. Microfotografía de una extensión sanguínea. Síndrome de la plaqueta gris. Muestra plaquetas agranulares.

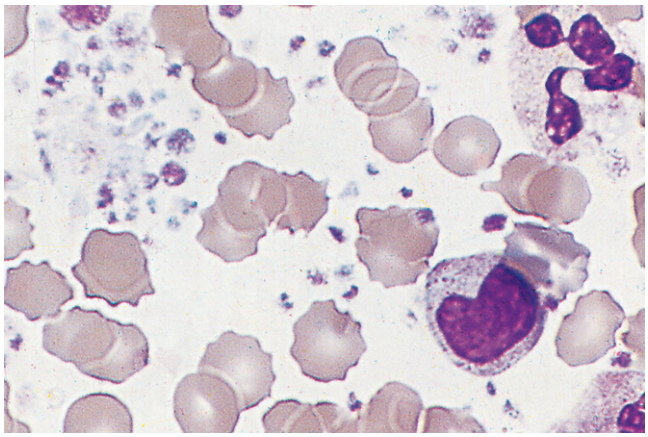


Figura 5.96. Microfotografía de una extensión sanguínea. Trastorno mieloproliferativo. Muestra anisocitosis plaquetaria con algunas plaquetas gigantes.

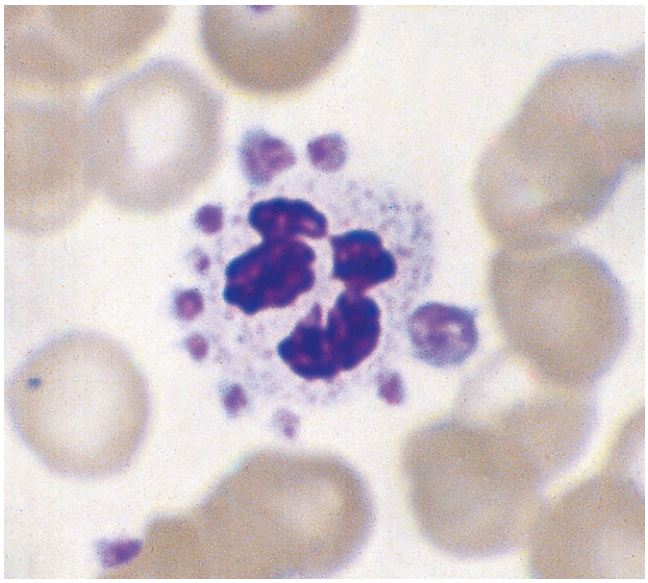


Figura 5.98. Microfotografía de una extensión sanguínea. Muestra adhesión de las plaquetas a un neutrófilo (satelitismo plaquetario).

un trastorno mieloproliferativo, pueden asociarse con una anisocitosis plaquetaria extrema, en la que hay algunas plaquetas tan grandes como los hematíes y a menudo plaquetas agranulares o hipogranulares (fig. 5.96). El recuento plaquetario aumenta frecuentemente en el estrés inflamatorio agudo o en la hemorragia, pero raras veces a más de 1.000×10^9/l. Si las cifras son superiores, a menos que el paciente sufra una enfermedad crítica, la causa es por lo general un trastorno mieloproliferativo.

En dos trastornos plaquetarios hereditarios asociados con hemorragia se observan características morfológicas típicas. Son el síndrome de Bernard–Soulier, en el que hay plaquetas gigantes con una agregación defectuosa a la ristocetina y el síndrome de la plaqueta gris, en el que las plaquetas no tienen gránulos y presentan un aspecto fantasmal en las extensiones sanguíneas teñidas (fig. 5.97). En la anomalía de May-Hegglin también se puede encontrar trombocitopenia.

En cerca del 1% de los individuos, el uso del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante origina la formación de agregados plaquetarios, que producen una seudotrombocitopenia[29]. No ocurre así cuando la sangre extraída se mezcla con cualquier otro anticoagulante[30]. Este fenómeno puede detectarse cuando origina una «alarma» en un contador automatizado de células sanguíneas; es identificable en la extensión sanguínea. No está asociado con ningún trastorno de la coagulación y la función plaquetaria es normal. En ocasiones, el EDTA puede inhibir también la tinción de las plaquetas[31].

A veces, se pueden observar plaquetas adheridas a los neutrófilos (fig. 5.98)[32–35]. Esto se ha notificado en pacientes que tienen autoanticuerpos antiplaquetarios demostrables[36], pero se ve más a menudo en individuos aparentemente sanos. No se observa en las extensiones hechas directamente con sangre que no ha sido anticoagulada.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

BIBLIOGRAFÍA

1. Marsh GW 1966 Abnormal contraction, distortion and fragmentation in human red cells. London University MD thesis.
2. Rodgers MS, Chang C-C, Kass L 1999 Elliptocytosis and tailed poikilocytes correlate with severity of iron deficiency anemia. American Journal of Clinical Pathology 111:672-675.
3. Sechi LA, De Carll S, Catena C, et al 1996 Benign familial macrocytosis. Clinical and Laboratory Haematology 18:41-43.
4. Rees DC, Dudley JA, Marinaki A 2003 Review: pyrimidine 5¢nucleotidase deficiency. British Journal of Haematology 120:375-383.
5. Tuffy P, Brown AK, Zuelzer WW 1959 Infantile pyknocytosis: a common erythrocyte abnormality of the first trimester. American Journal of Diseases of Children 98:227-241.
6. Keimowitz R, Desforges JF 1965 Infantile pyknocytosis. New England Journal of Medicine 273:1152-1154.
7. Bessis M 1972 Red cell shapes: an illustrated classification and its rationale. Nouvelle Revue Francaise d'Hematologie 12:721-745.
8. Burns ER, Lou Y, Pathak A 2004 Morphological diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura. American Journal of Hematology 75, 18-21.
9. Estes JW, Morley TJ, Levine IM et al 1967 A new hereditary acanthocytosis syndrome. American Journal of Medicine 42:868-881.
10. Mier M, Schwartz SO, Boshes B 1960 Acanthrocytosis [sic], pigmented degeneration of the retina and ataxic neuropathy: a genetically determined syndrome with associated metabolic disorder. Blood 16:1586-1608.
11. Salt HB, Wolfe OH, Lloyd JK, et al 1960 On having no beta-lipoprotein: a syndrome comprising a-beta-lipoprotinaemia, acanthocytosis, and steatorrhoea. Lancet ii:325-329.
12. Wimer BM, Marsh WL, Taswel HF, et al 1977 Haematological changes associated with the McLeod phenotype of the Kell blood group system. British Journal of Haematology 36:219-224.
13. Silber R, Amorosi EL, Howe J, et al 1966 Spur-shaped erythrocytes in Laennec's cirrhosis. New England Journal of Medicine 275:639-643.
14. Ponder E 1948 Hemolysis and related phenomena. Grune & Stratton, New York.
15. Feo CJ, Tchernia G, Subtu E, et al 1978 Observation of echinocytosis in eight patients: a phase contrast and SEM study. British Journal of Haematology 40:519-526.
16. Crook M, Williams W, Schey S 1998 Target cells and stomatocytes in heterozygous familial hypobetalipoproteinaemia. European Journal of Haematology 60:68-69.
17. Lock SP, Sephton Smith R, Hardisty RM 1961 Stomatocytosis: a hereditary red cell anomaly associated with haemolytic anaemia. British Journal of Haematology 7:303-314.
18. Ducrou W, Kimber RJ 1969 Stomatocytes, haemolytic anaemia and abdominal pain in Mediterranean migrants: some examples of a new syndrome? Medical Journal of Australia ii:1087-1091.
19. Norman JG 1969 Stomatocytosis in migrants of Mediterranean origin. Medical Journal of Australia i:315.
20. Douglass C, Twomey J 1970 Transient stomatocytosis with hemolysis: a previously unrecognized complication of alcoholism. Annals of Internal Medicine 72:159-164.
21. Weed RI, Bessis M 1973 The discocyte-stomatocyte equilibrium of normal and pathologic red cells. Blood 41:471-475.
22. Brecher G, Bessis M 1972 Present status of spiculated red cells and their relationship to the discocyte-echinocyte transformation: a critical review. Blood 40:333-344.
23. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al 1976 Proposals for the classification of the acute leukaemias (FAB cooperative group). British Journal of Haematology 33:451-458.
24. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al 1985 Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. Annals of Internal Medicine 103:620-625.
25. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al 1999 World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee Meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. Journal of Clinical Oncology 17:3835-3849.
26. Deal J, Hernandez AM, Pierre RV 1995 Ethylenediamine tetraacetic acid-associated leukoagglutination. American Journal of Clinical Pathology 103:338-340.
27. Howard MR, Smith RA 1999 Early diagnosis of septicaemia in preterm infants from examination of the peripheral blood films. Clinical and Laboratory Haematology 21:365-368.
28. Westerman DA, Evans D, Metz J 1999 Neutrophil hypersegmentation in iron deficiency anaemia: a case control study. British Journal of Haematology 107:512-515.
29. Gowland E, Kay HEM, Spillman JC, et al 1969 Agglutination of platelets by a serum factor in the presence of EDTA. Journal of Clinical Pathology 22:460-454.
30. Criswell KA, Breider MA, Bleavins MR 20901 EDTA-dependent platelet phagocytosis. A cytochemical, ultrastructural and functional characterization. American Journal of Clinical Pathology 115:376-384.
31. Stavem P, Berg K 1973 A macromolecular serum component acting on platelets in the presence of EDTA—"Platelet stain preventing factor." Scandinavian Journal of Haematology 10:202-208.
32. Crome PE, Barkhan P 1963 Platelet adherence to polymorphs. British Medical Journal ii:871.
33. Field EJ, Macleod I 1963 Platelet adherence to polymorphs. British Medical Journal ii:388.
34. Greipp PR, Gralnick HR 1976 Platelet to leucocyte adherence phenomena associated with thrombocytopenia. Blood 47:513-521.
35. Skinnider LF, Musclow CE, Kahn W 1978 Platelet satellitism: an ultrastructural study. American Journal of Hematology 4:179-185.
36. White LA Jr, Brubaker LH, Aster RH, et al 1978 Platelet satellitism and phagocytosis by neutrophils: association with antiplatelet antibodies and lymphoma. American Journal of Hematology 4:313-323.
37. Van Assendelft OW, McGrath C, Murphy RS, et al 1977 The differential distribution of leukocytes. In: Koepke JA (ed) CAP Aspen conference: differential leukocyte counting. College of American Pathologists, Northfield, IL.

6 Biopsia de la médula ósea

Imelda Bates

Aspiración de la médula ósea 100
Realización de un aspirado de la médula ósea 100
Punción del ilion 100
Punción del esternón 100
Punción de las apófisis espinosas 101
Comparación entre los distintos sitios de punción ósea 101
Aspiración de la médula ósea en niños 101
Agujas de punción medular 101
Tratamiento de los aspirados de médula ósea 102
Preparación de extensiones a partir de aspirados de médula ósea 102
Concentración de la médula ósea por centrifugación 103
Preparación de extensiones de médula ósea *post mortem* 103
Examen de los aspirados de médula ósea 103
Recuentos celulares cuantitativos en los aspirados de médula ósea 103
Recuentos celulares diferenciales en los aspirados de médula ósea 104
Fuentes de error y variaciones fisiológicas 104
Cocientes celulares 105
Informes sobre las extensiones de aspirados de médula ósea 105
Esquema sistemático para examinar las extensiones de aspirado de médula ósea 106
Informes de los resultados 106
Preparación de cortes de grumos de aspirado de médula ósea 106
Biopsia por trepanación percutánea de la médula ósea 108
Complicaciones de la biopsia de médula ósea 108
Improntas de las muestras de biopsia de la médula ósea por trepanación 108
Tratamiento de las muestras de biopsia de médula ósea por trepanación 109
Tinción de los cortes de las muestras de biopsia de médula ósea por trepanación 109

La biopsia de la médula ósea es un elemento indispensable en el estudio de las enfermedades de la sangre y quizás la única forma de realizar un diagnóstico correcto. La médula se puede obtener por aspiración a través de una aguja, por biopsia por trepanación percutánea o por biopsia quirúrgica. Si se practica correctamente, la aspiración de la médula ósea es sencilla y segura; puede repetirse muchas veces y realizarse de forma ambulatoria. Parece ser segura en casi todas las ocasiones, incluso en presencia de una púrpura trombocitopénica. Sin embargo, cuando existe un trastorno importante de la coagulación, como es el caso de la hemofilia, no debe realizarse jamás sin una cobertura apropiada y sin haber confirmado el trastorno con las pruebas de los factores de coagulación con anterioridad al procedimiento. La biopsia por trepanación es un poco más complicada pero también puede realizarse de forma ambulatoria.

La desventaja del aspirado de médula ósea en comparación con la biopsia por trepanación radica en que la disposición de las células en la médula y la relación entre ellas queda distorsionada por el proceso de aspiración y, en las médulas fibróticas, se puede aspirar sangre en lugar de médula. No obstante, cuando se aspira médula, las células individuales están bien conservadas. Tras la tinción, se pueden encontrar sutiles diferencias entre las células en mucho mayor grado que con el material histológico. El principal valor de la biopsia por trepanación consiste en su capacidad de aportar información sobre la estructura de fragmentos de médula relativamente grandes. Al mismo tiempo, se pueden identificar las características morfológicas de las células individuales realizando una impronta del material obtenido.

Los estudios de un gran número de casos han demostrado que los especímenes de la biopsia por trepanación son mejores que las extensiones del material aspirado en algunas circunstancias (p. ej., para diagnosticar la afectación medular en los linfomas o en las enfermedades neoplásicas no hematológicas). Sin embargo, son raras las veces en que el sencillo procedimiento de la aspiración medular no es capaz de aportar información importante en los pacientes con una hemopatía. Las dos técnicas tienen papeles importantes y complementarios en la investigación clínica[1,2].

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

ASPIRACIÓN DE LA MÉDULA ÓSEA

Habitualmente se pueden aspirar muestras satisfactorias de la médula ósea del esternón, de la cresta ilíaca o de la espina ilíaca anterior o posterior. En la mayoría de los pacientes se puede hacer el procedimiento con analgesia oral o local sin recurrir a la sedación intravenosa[3]. Las espinas ilíacas tienen la ventaja de que, en caso de no ser posible aspirar material, se puede realizar una biopsia por trepanación inmediatamente. Sin embargo, en los sujetos obesos o inmovilizados puede haber dificultades técnicas en estos sitios y, en ocasiones, puede ser necesaria la punción del esternón. No se debe utilizar el esternón como sitio de elección en los niños. En los adultos, a menos que se inserte correctamente la aguja en el esternón, existe el peligro de perforar la capa cortical interna y dañar los grandes vasos sanguíneos y la aurícula derecha subyacentes, con consecuencias graves[4].

Realización de un aspirado de la médula ósea

El aspirado de la médula ósea se llevará a cabo utilizando únicamente las agujas diseñadas con este fin (analizadas más adelante). El operador usará siempre guantes quirúrgicos para hacer una biopsia de la médula ósea y pondrá especial cuidado para evitar las lesiones por pinchazo de aguja. Para realizar un aspirado de la médula ósea, se limpiará la piel de la zona con alcohol al 70% (p. ej., etanol) o con clorhexidina al 0,5% (5% en dilución 1 a 10 en etanol). Infiltrar la piel, el tejido subcutáneo y el periostio suprayacentes al sitio seleccionado con un anestésico local, como lidocaína al 2%, en cantidad de 2 a 5 ml. Esperar hasta que haga efecto la anestesia. Con un movimiento perforante, introducir la aguja perpendicularmente en la cavidad del ilion en el centro de la espina ilíaca oval posterosuperior o 2 cm posterior y 2 cm inferior a la espina ilíaca anterosuperior. Cuando se haya penetrado en el hueso, retirar el fiador, conectar una jeringa de 1 o 2 ml y aspirar el contenido medular para realizar las extensiones. Si se necesita una muestra mayor (p. ej., para un análisis citogenético o de inmunofenotipado), conectar una segunda jeringa de 5 o 10 ml y aspirar otra muestra. Por regla general, se puede aspirar el material en la jeringa sin dificultad; a veces, puede ser necesario reinsertar el fiador, introducir la aguja un poco más en profundidad y aspirar de nuevo. La incapacidad para aspirar la médula (efecto «grifo seco») sugiere una fibrosis de la médula ósea o una infiltración. La obtención de muestras de médula guiada por tomografía computarizada puede ser útil en pacientes obesos, en los que es difícil localizar la espina ilíaca[5].

Dado que la médula ósea se coagula más rápidamente que la sangre periférica, hay que realizar las extensiones del material aspirado sin demora a la cabecera del enfermo. El resto del material se puede dejar en un tubo que contenga una cantidad apropiada de anticoagulante a base de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y utilizarlo más tarde para hacer más extensiones. Si hay que hacer estudios citogenéticos o de fenotipado, se puede utilizar heparina sin conservante en lugar del EDTA. Parte del material puede conservarse con un fijador en vez de con un anticoagulante para la preparación de cortes histológicos (v. pág. 106). Fijar alguna de las extensiones en metanol absoluto, tan pronto como se hayan secado, para su tinción posterior con un método de Romanowsky o con el colorante de Perls para el hierro. Estas extensiones son también adecuadas para la tinción citoquímica (v. cap. 13). Si nos hemos encontrado sin material por aspiración («grifo seco»), insertar el fiador en la aguja y empujar cualquier partícula de material en la luz de la misma sobre un portaobjetos; en los linfomas y en los carcinomas sobre todo, se puede obtener material suficiente para hacer un diagnóstico[6].

Punción del ilion

Los sitios habituales para la punción en adultos son la espina ilíaca posterior y, menos frecuentemente, la anterior. Si se van a realizar punciones en serie, se debe elegir un sitio diferente en cada ocasión para evitar aspirar médula que haya sido diluida por la hemorragia resultante de punciones previas. La espina ilíaca posterior recubre una gran zona con contenido medular, de la que se pueden aspirar cantidades relativamente grandes de médula. La punción ilíaca posterior se puede realizar con el paciente en decúbito lateral, como para una punción lumbar, o en decúbito prono. La espina ilíaca anterosuperior puede ser más fácil de localizar en los individuos muy obesos y se considera que el hueso que la recubre es más delgado que el de la cresta ilíaca.

Punción del esternón

La punción del esternón debe realizarse con cuidado para evitar atravesar el hueso con la aguja de aspiración. El sitio habitual para la punción es el manubrio o la primera o segunda parte del cuerpo del esternón. El manubrio está formado por un hueso bastante más denso que el cuerpo del esternón y, al menos en los sujetos ancianos, tiende a contener una médula más grasa que la que se encuentra en cualquier otro lugar del esternón. Aquí, el grosor de la corteza varía de 0,2 a 5,0 mm, por lo que puede resultar difícil estar seguro de que la punta de la aguja haya alcanzado la cavidad del hueso.

El sitio para la punción del manubrio se localiza alrededor de 1 cm por encima del ángulo esternomanubrial y ligeramente hacia un lado de la línea media; si se va a puncionar el cuerpo del hueso, se hará frente al segundo espacio intercostal ligeramente lateral a la línea media. Es fundamental utilizar una aguja con un dispositivo de seguridad para evitar deslizamientos, como la del tipo Klima. Tras perforar la piel y los tejidos subcutáneos, cuando la punta de la aguja alcanza el periostio, hay que regular el dispositivo de seguridad de la aguja para permitir que ésta penetre unos 5 mm más. Si el dispositivo de seguridad no se puede avanzar hasta ese punto, no es seguro continuar con el procedimiento. Empujar la aguja con un movimiento perforante en la cavidad ósea. Habitualmente, es fácil apreciar cuándo se ha penetrado en la cavidad del hueso. En ese momento, se realiza la aspiración como se ha descrito antes.

Punción de las apófisis espinosas

En los adultos, se pueden obtener buenas muestras de médula puncionando las apófisis de las vértebras lumbares. La punción no es difícil porque los huesos están dispuestos de forma superficial, pero se requiere más presión que para la punción ilíaca o esternal. Introducir la aguja en la apófisis de una vértebra lumbar ligeramente lateral a la línea media con una dirección en ángulo recto a la superficie cutánea, ya sea con el paciente sentado o en decúbito lateral como para una punción lumbar.

Comparación entre los distintos sitios de punción ósea

Hay una gran variación en la composición celular de la médula extraída de sitios adyacentes o de sitios diferentes. La aspiración de un solo sitio puede dar una información engañosa; esto es cierto sobre todo en la anemia aplásica, porque la médula puede estar afectada de forma irregular[7]. Sin embargo, en general, la celularidad global, las rutas de maduración hemopoyética y el equilibrio entre la eritropoyesis y la leucopoyesis son similares en todos los sitios. En la práctica, es una ventaja poder elegir entre diferentes sitios para la punción, sobre todo cuando la punción en algún sitio encuentra un «grifo seco» o cuando sólo se extrae sangre periférica. Con la aspiración en un sitio diferente se puede obtener una médula celular o reforzar la sospecha de la existencia de una amplia transformación que esté afectando a la médula ósea, como en el caso de una fibrosis o de una hipoplasia. En la anemia aplásica, pueden ser necesarias varias punciones para llegar a un diagnóstico.

ASPIRACIÓN DE LA MÉDULA ÓSEA EN NIÑOS

La punción ilíaca, sobre todo en la región de la espina posterior, es habitualmente el lugar de elección en los niños. En ocasiones, en un niño mayor con obesidad, no se puede apreciar la espina ilíaca posterior. En este caso, se puede obtener una muestra satisfactoria del ilion anterior. En los niños pequeños, se puede extraer la médula de la cara medial del extremo proximal de la tibia, justo por debajo de la tuberosidad tibial. Se debe extremar la precaución en este sitio por su vulnerabilidad a las fracturas y a la laceración de los vasos sanguíneos principales adyacentes. En los niños mayores, el hueso cortical tibial suele ser demasiado denso y la médula en su interior es, por lo general, menos activa. Hay que tener presente que se debe evitar la punción esternal en niños porque el hueso es delgado y las cavidades medulares pequeñas.

AGUJAS DE PUNCIÓN MEDULAR

Las agujas deben ser gruesas y estar fabricadas de acero inoxidable resistente; su longitud será de 7-8 cm, e irán provistas de un fiador que se ajuste perfectamente y un dispositivo de seguridad ajustable. En las agujas reutilizables, la punta de la aguja y el extremo del bisel han de mantenerse bien afilados. Las agujas reutilizables más habituales son las agujas Salah y Klima (fig. 6.1). Islam desarrolló una aguja ligeramente más grande con un mango en forma de T en el extremo proximal (fig. 6.2); éste proporciona mejor



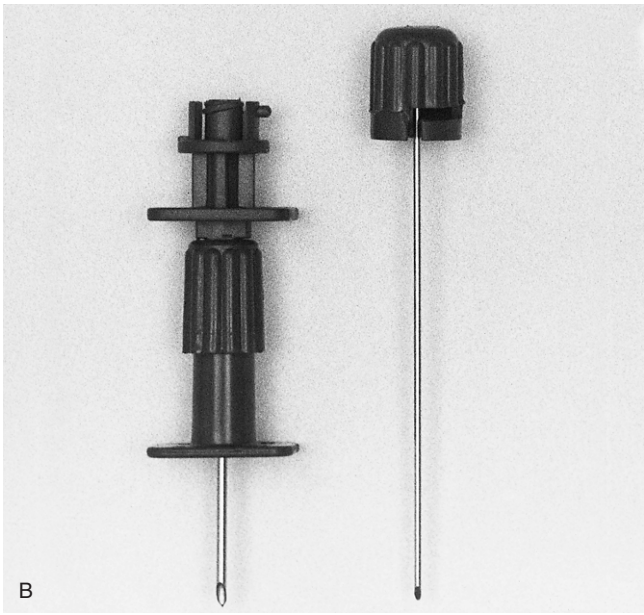


Figura 6.1. Agujas de médula ósea desechables. Para la biopsia por trepanación (A) y para la aspiración (B) (reducida ×0,75).

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

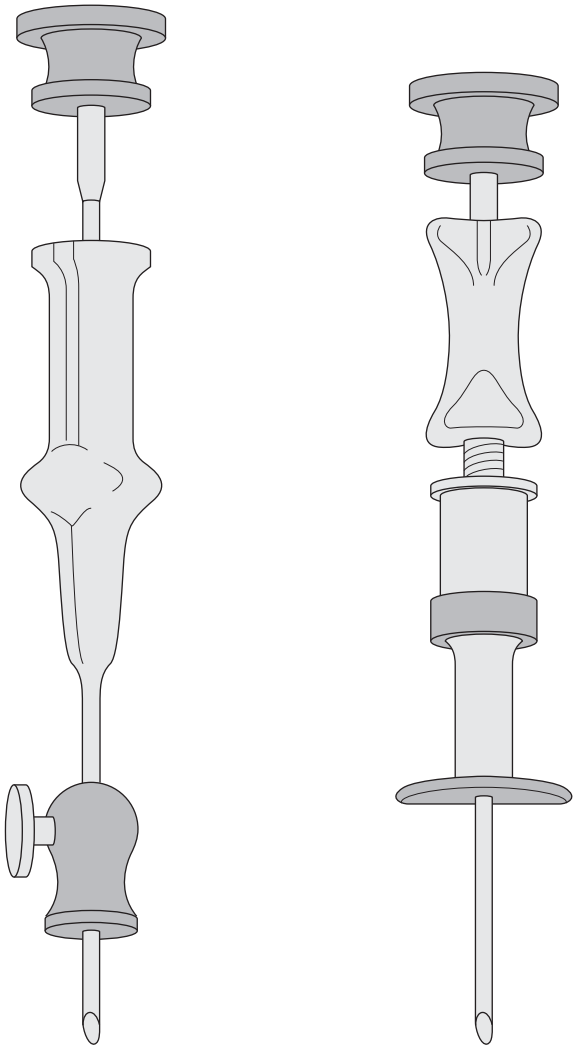


Figura 6.2. Agujas de punción medular. Salah *(izquierda)* y Klima *(derecha)* (reducida ×0,75).

sujeción, es más maniobrable y proporciona mayores probabilidades de éxito en las biopsias del hueso excesivamente duro (p. ej., osteoesclerótico) o blando (p. ej., extremadamente osteoporótico)[8]. Una versión modificada de la aguja de Islam presenta múltiples agujeros en la porción distal del vástago, además del orificio de la punta, para reducir el error de muestreo cuando la médula no está afectada de manera uniforme por una lesión patológica. Actualmente disponemos de diversos tipos de agujas desechables para aspiración de médula ósea y para biopsia por trepanación; su diseño es similar al de las agujas reutilizables tradicionales (fig. 6.3).

TRATAMIENTO DE LOS ASPIRADOS DE MÉDULA ÓSEA

No es necesario aspirar más de 0,3 ml de líquido medular de un solo sitio para el examen morfológico, porque incrementaríamos la dilución con sangre periférica. Si se necesitan grandes cantidades de médula para diversas pruebas, como los estudios moleculares, los citogenéticos y los de inmunofenotipado, se puede desconectar la jeringa de la aguja de aspiración y volver a colocar el fiador, dejando la aguja de aspiración en el hueso. Después de que se hayan preparado los frotis medulares, se puede conectar la misma u otra jeringa a la aguja y aspirar otros 5-10 ml de médula.

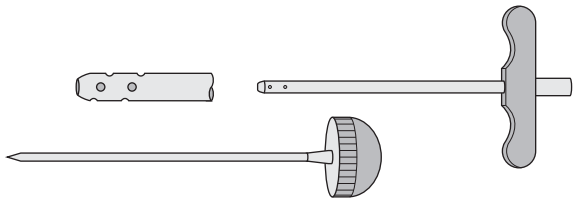


Figura 6.3. Aguja Islam de aspiración de médula ósea. El mango con forma de cúpula y la barra en T están diseñados para proporcionar estabilidad y control durante la operación.

Es una buena práctica obtener una muestra de sangre periférica del paciente al mismo tiempo que de médula ósea, de forma que se puedan examinar y almacenar conjuntamente ambos especímenes. Esto se puede hacer de forma sencilla preparando algunas extensiones de la sangre obtenida por punción en un dedo tras finalizar el muestreo de la médula ósea o por venopunción, de manera que se pueda realizar un hemograma completo. La extensión sanguínea se guardará de forma permanente con las extensiones de médula ósea.

Preparación de extensiones a partir de aspirados de médula ósea

Hacer extensiones de 3-5 cm de longitud de la médula aspirada utilizando un extensor de cristal de borde redondeado que no tenga más de 2 cm de anchura (fig. 6.4). Los grumos medulares quedan rezagados detrás del extensor y dejan un rastro de células detrás de ellos. La extensión se realiza hacia el área en que se pondrá la etiqueta para evitar que haya partículas arrastradas hacia la punta del portaobjetos, donde es difícil examinarlas. Si no hay grumos suficientes, se pueden concentrar. Esto no suele ser necesario en las médulas con mucha riqueza celular, como en la leucemia mieloide aguda y crónica y en la anemia megaloblástica. La concentración de la médula se puede conseguir depositando gotas aisladas del aspirado en el portaobjetos a aproximadamente 1 cm del extremo. La mayor parte de la sangre es rápidamente succionada del borde de la gota con la jeringa de la médula o con una pipeta de plástico fina. Los grumos de médula de forma irregular tienden a quedarse rezagados en el portaobjetos y pueden despegarse con el extensor; en ese momento se pueden preparar los frotis como se ha explicado anteriormente.

Tras un secado minucioso, se fijan las extensiones de médula ósea y se tiñen con los colorantes de Romanowsky, como para las extensiones de sangre periférica. No obstante, es esencial un tiempo de fijación mayor (al menos



Figura 6.4. Extensión del aspirado de médula ósea. Los grumos medulares son fácilmente visibles, la mayoría en la cola de la extensión (×1,5).

20 min en metanol) para que la tinción sea de alta calidad. Si se necesita teñir una extensión de forma urgente, fijar y teñir solamente una extensión y dejar que las otras se sequen completamente. De esta forma se evita que todas las extensiones muestren artefactos resultantes de la fijación antes de que se haya conseguido un secado exhaustivo. Las extensiones pueden teñirse también con el método de Perls para demostrar la presencia o la ausencia de hierro. Puede ser necesario secar las extensiones durante toda la noche para conseguir resultados óptimos con las tinciones de Perls sobre secciones obtenidas a partir de aspirados secos. Se ha notificado un rango de normalidad del 30-80% en la espina ilíaca anterior.

Únicamente se podrá considerar satisfactoria la preparación cuando puedan verse los grumos de médula y las células medulares libres en las extensiones teñidas. Los recuentos diferenciales deben hacerse en los rastros celulares, comenzando por el grumo medular y trabajando de forma retrógrada hacia la cabeza de la extensión; así, habrá menos cantidad de células de sangre periférica incluidas en el recuento diferencial.

Cuando se mezcla la médula aspirada en un tubo con un anticoagulante (p. ej., EDTA seco) hay que prestar atención para utilizar las cantidades apropiadas según el volumen de médula que se quiere anticoagular. Cuando se realizan extensiones de médula con un gran contenido de anticoagulante (como cuando se añaden unas cuantas gotas de médula en un tubo que contenga suficiente EDTA para impedir la coagulación de 5 ml de sangre), se pueden observar masas de material amorfo que se tiñen de color rosa y agregados de eritroblastos y de reticulocitos.

Concentración de la médula ósea por centrifugación

La centrifugación se puede utilizar para concentrar las células de la médula y para valorar las proporciones relativas de células medulares, sangre periférica y grasa en el material aspirado. Así como el concentrado de muestras con escasa celularidad es útil, sobre todo cuando hay una célula anómala presente en pequeñas cantidades[9], éste no es necesario cuando la celularidad del material aspirado es media o está aumentada. Los datos volumétricos tienen también un escaso valor en los pacientes individuales dado el amplio rango de valores encontrados incluso en estado de normalidad. En la página 59 se describen los métodos para la separación de las células de la médula.

Preparación de extensiones de médula ósea *post mortem*

Las extensiones realizadas de médula ósea obtenida *post mortem* raras veces son satisfactorias. Si se quiere obtener resultados satisfactorios, hay que realizar el procedimiento tan pronto como sea posible tras el fallecimiento. Cuando se extiende la médula de forma ordinaria, la mayoría de las células tienden a romperse y a aparecer como manchas. Se ha estudiado el cociente y el patrón de la autólisis celular durante las primeras 15 h tras el fallecimiento y se han definido las diferencias entre los cambios de la autólisis *post mortem* y los que ocurren en vida como resultado de hemopatías[10]. Las células sanguíneas se conservan mucho mejor si se suspende una pequeña cantidad de médula en 1-2 ml de albúmina bovina al 5% (1 volumen de albúmina al 30%, 5 volúmenes de NaCl, 9 g/l). Después se centrifuga la suspensión y las células de la médula que se hayan depositado se vuelven a colocar en suspensión en un volumen de sobrenadante que es aproximadamente igual, o ligeramente inferior, al del depósito. Las extensiones se hacen a partir de esta suspensión de la forma habitual.

EXAMEN DE LOS ASPIRADOS DE MÉDULA ÓSEA

Recuentos celulares cuantitativos en los aspirados de médula ósea

En la bibliografía se indican algunos valores para el contenido celular de la médula ósea normal aspirada[11,12]. El porcentaje de médula en el esternón de los adultos sanos que es celular en vez de graso es del 48-79%. No obstante, la cuantificación del contenido celular de la médula aspirada no es fiable debido a la tendencia de la médula a ser aspirada en forma de partículas de diferente tamaño así

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

como de células libres, y al incontrolable factor de la dilución con la sangre periférica, que, según ciertos autores, puede llegar a ser del 40 al 100% en las muestras de médula ósea de 0,25-0,5 ml.

Los recuentos celulares cuantitativos en los aspirados de médula ósea son, por tanto, difíciles de interpretar. Con fines prácticos, se puede valorar el grado de celularidad medular dentro de amplios límites como aumentado, normal o reducido mediante la inspección de una extensión teñida que contenga grumos de médula. Como guía general, si las células hemopoyéticas ocupan menos del 25% del grumo, éste se considera hipocelular, mientras que si ocupan más del 75-80%, se considera hipercelular. Se puede obtener una medición cuantitativa menos subjetiva mediante el «recuento puntual» de las secciones; se ha notificado un rango normal de 30-80% en la espina ilíaca anterior.

Se han de tener en cuenta las variaciones fisiológicas en el contenido celular. La celularidad de la médula se ve afectada por la edad. En los adultos, hay menor proporción de cavidad medular ocupada por la médula hemopoyética que en los niños y está aumentada la proporción de células grasas con respecto a las células medulares. En un estudio en el que se utilizaba el recuento puntual de secciones histológicas de la cresta ilíaca, se notificó un rango de celularidad en niños menores de 10 años del 59-95% con una media del 79%; a los 30 años, la media fue del 50%, y a los 70 años, del 30% con un rango del 11-47%. La reducción de la celularidad en los sujetos ancianos es incluso más marcada en el manubrio esternal. La médula experimenta una hiperplasia de ligera a moderada en el embarazo.

Recuentos celulares diferenciales en los aspirados de médula ósea

Con fines generales, no suele ser necesario documentar la proporción que existe en cada estadio de cada tipo celular presente en la médula presente en el portaobjetos. En general resulta adecuado un diferencial sobre 200-500 células, utilizando las categorías celulares eritroide, mieloide, linfoide y plasmática, siempre que se utilice un esquema sistemático para examinar la morfología, tanto de éstas como de las demás células. En algunos trastornos, como la leucemia mieloide crónica y los síndromes mielodisplásicos, los recuentos diferenciales detallados son importantes porque los resultados pueden indicar el pronóstico y condicionar el tratamiento. En ocasiones puede ser importante el recuento específico de un solo tipo celular (p. ej., los blastos en la leucemia aguda para valorar la respuesta a la quimioterapia). Hay que comparar las extensiones de seguimiento de la médula ósea con las extensiones anteriores para valorar el curso de la enfermedad o el efecto del tratamiento.

Fuentes de error y variaciones fisiológicas

Dado el variopinto patrón natural de la médula ósea, la distribución irregular de las células medulares al extenderlas en los portaobjetos y el grado variable de dilución con la sangre, los recuentos celulares diferenciales en los aspirados de médula ósea de los sujetos normales varían enormemente. La aspiración de sólo un pequeño volumen y el recuento de células en los rastros celulares que quedan tras los grumos de la médula al extenderlos en el portaobjetos minimizan el efecto de dilución de la sangre. Cuando hay un incremento de la reticulina medular asociada, algunos de los tipos celulares pueden resistirse a la aspiración o permanecer incrustados en los fragmentos medulares, quedando por tanto infrarrepresentados en el recuento diferencial. Los megacariocitos en particular están irregularmente distribuidos y tienden a ser arrastrados hacia la cola de la extensión. La aspiración casual de un folículo linfoide produciría un porcentaje anormalmente elevado de linfocitos[13].

De forma ideal, los recuentos diferenciales deberían realizarse en el material de la sección histológica, pero las dificultades para la identificación lo hacen impracticable. La inclusión en metacrilato representa una mejor oportunidad para la identificación correcta de las células. La incidencia de los diversos tipos celulares se expresa habitualmente como porcentaje. Los valores normales de los diferenciales celulares en la médula ósea (tabla 6.1) pueden tomarse únicamente como una indicación aproximada[11,12]. La composición celular de la médula ósea difiere entre lactantes, ni-

Tabla 6.1. Rangos normales de los recuentos celulares diferenciales en la médula ósea aspirada

	Rango del 95%	Media[12]	Media[11]
Mielobastos	0–3	1,4	0,4
Promielocitos	3–12	7,8	13,7[a]
Mielocitos (neutrófilos)	2–13	7,6	–
Metamielocitos	2–6	4,1	–
Neutrófilos	22–46	32,1[H]; 37,4[M]	35,5
Mielocitos (eosinófilos)	0–3	1,3	1,6
Eosinófilos	0,3–4	2,2	1,7
Basófilos	0–0,5	0,1	0,2
Linfocitos	5–20	13,1	16,1
Monocitos	0–3	1,3	2,5
Células plasmáticas	0–3,5	0,6	1,9
Eritroblastos[b]	5–35	28,1[H]; 22,5[M]	23,5
Megacariocitos	0–2	0,5	
Macrófagos	0–2	0,4	2,0

[a] Incluye todos los «neutrófilos inmaduros».
[b] Datos del hospital Hammersmith: Proeritroblastos, 0,5–5; eritroblastos precoces, 2–20; eritroblastos tardíos, 2–10.
[H] Hombres.
[M] Mujeres.

ños y adultos jóvenes normales. La variación es notable en el primer año y sobre todo en el primer mes. El porcentaje de eritroblastos se reduce desde el nacimiento y a las 2-3 semanas constituyen solamente alrededor del 10% de las células nucleadas. Las células mieloides (precursoras de los granulocitos) aumentan durante las 2 primeras semanas de vida, tras las cuales se produce una reducción aguda hacia, aproximadamente, la tercera semana; sin embargo, al final del primer mes cerca del 60% de las células son mieloides. Los linfocitos constituyen hasta el 40% de las células nucleadas en la médula ósea de los lactantes; el valor medio a los 2 años es aproximadamente del 20%, disminuyendo hasta cerca del 15% durante el resto de la infancia. El porcentaje de células plasmáticas es particularmente bajo desde la lactancia hasta la edad de 5 años.

La hiperplasia que se produce en el embarazo afecta tanto a la eritropoyesis como a la granulopoyesis; esta última, no obstante, se ve afectada en menor medida, aunque con un cierto incremento en la proporción relativa de células inmaduras. La hiperplasia es máxima en el tercer trimestre; el regreso a la normalidad comienza en el puerperio pero no termina hasta al menos 6 semanas tras el parto.

Cocientes celulares

Los cocientes basados en un recuento de 200-500 células pueden proporcionar una información cualitativa de utilidad. El cociente mieloide:eritroide se ha utilizado ampliamente y corresponde al cociente entre los neutrófilos y las células precursoras de los neutrófilos con respecto a los precursores eritroides. La inclusión de monocitos, eosinófilos y basófilos es objeto de controversia, pero en la práctica apenas si hay diferencia con el cociente global, que oscila entre 2:1 a 4:1. Como alternativa, se puede calcular el cociente leuco-eritroide. En él se excluyen las células maduras; se ha notificado que el cociente normal es de 0,56-2,67:1. El cociente mieloide:linfoide varía ampliamente (1-17:1) y el cociente linfoide:eritroide tiene una amplitud de variación similar (0,2-4,0:1).

INFORMES SOBRE LAS EXTENSIONES DE ASPIRADOS DE MÉDULA ÓSEA

El examen sistemático del aspirado de la médula ósea, junto con el conocimiento del contexto clínico, constituyen la mejor oportunidad para llegar a un diagnóstico. Se seleccionan varias de las extensiones teñidas mejor extendidas que contengan grumos medulares fácilmente distinguibles. A continuación se examinan varias partículas con un objetivo de baja resolución (×10) para determinar si la médula es hipo, normo o hipercelular (fig. 6.5). En esta fase del examen se deben buscar los megacariocitos y los agregados de células no hemopoyéticas (p. ej., las células metastásicas de un carcinoma); dichas células suelen encontrarse hacia la cola de la extensión.

Se escoge un área de la extensión con mucha celularidad para examinarla detalladamente, utilizando aún el objetivo ×10; en el área escogida las células nucleadas deben estar bien teñidas y bien extendidas. Este tipo de área puede encontrarse, por lo general, hacia la cola de las extensiones, detrás de los grumos de médula. Se examinan entonces las células de estas áreas con un objetivo de alta

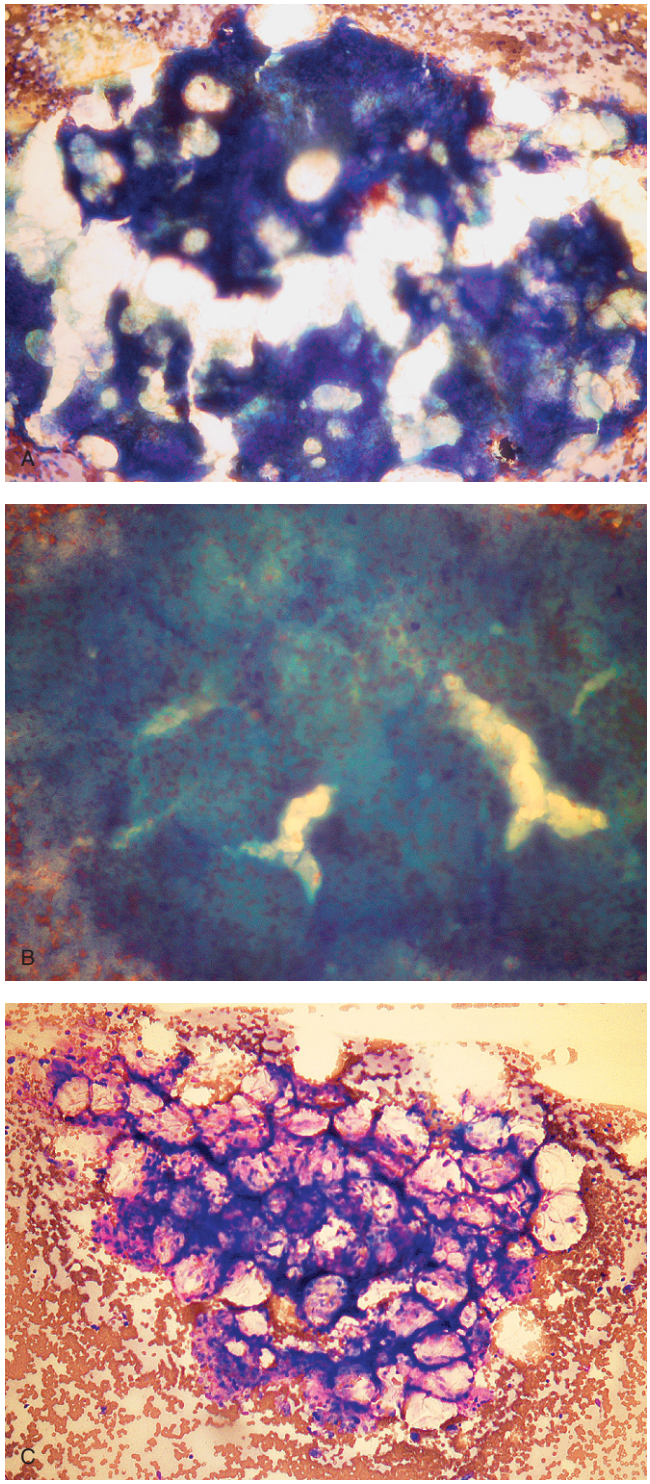


Figura 6.5. Extensión del aspirado de la médula ósea. Microfotografías de los grumos en las que se observa la celularidad: A, normal; B, hipercelular, y C, hipocelular.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

resolución (p. ej., ×40) y posteriormente, si es necesario, con el objetivo de inmersión en aceite ×100. Es importante examinar siempre las médulas de manera exhaustiva porque es muy fácil pasar por alto las anomalías sutiles. A continuación se muestra un modelo de examen recomendado.

Esquema sistemático para examinar las extensiones de aspirado de médula ósea

Baja resolución (×10)

- Determinar la celularidad examinando varias partículas.
- Identificar los megacariocitos y anotar la morfología y la secuencia de maduración (puede ser necesaria una mayor resolución para los pequeños megacariocitos inmaduros y para los micromegacariocitos).
- Buscar agregados de células anómalas que puedan indicar un infiltrado de un tumor metastásico (se necesita una mayor resolución para examinar el contenido y la morfología de los agregados).
- Identificar los macrófagos y examinarlos con alta resolución para evidenciar la hemofagocitosis, el pigmento del paludismo y los agentes infecciosos bacterianos o fúngicos que puedan estar presentes en el citoplasma.

Alta resolución (×40, ×100 inmersión en aceite)

- Identificar todas las etapas de maduración de las células mieloides y eritroides. Esto se consigue más fácilmente comenzando con los eritrocitos maduros y retrocediendo hasta las células más inmaduras. Repetir el proceso para la serie mieloide comenzando con los neutrófilos maduros. Las anomalías de la maduración, como los pronormoblastos gigantes o la evidencia de una maduración disfuncional, incluyendo la asincronía nuclear-citoplasmática, sugieren diagnósticos específicos, como la infección por parvovirus B19, los síndromes mielodisplásicos o la anemia megaloblástica, respectivamente. Los cambios en la proporción entre células mieloides primitivas y células maduras pueden reflejar la respuesta al tratamiento en la leucemia o la recuperación de una agranulocitosis, y el porcentaje de células blásticas puede ser importante para la diferenciación de las anemias refractarias y para valorar el pronóstico de la leucemia.
- Determinar el cociente mieloide:eritroide. Así como la falta de células mieloides puede ser evidente sin realizar un recuento diferencial formal, es fácil pasar por alto el incremento de células eritroides, que puede indicar una pérdida de sangre o una destrucción periférica.
- Realizar un recuento diferencial (v. pág. 104) utilizando las categorías de células eritroides, mieloides, linfoides, plasmáticas y «otras», anotando simultáneamente cualquier anomalía morfológica. El porcentaje normal de linfocitos en la médula ósea es 5-20%; no es probable que los incrementos moderados de hasta un 30-40%, que pueden ser indicativos de un trastorno importante como un linfoma, se identifiquen simplemente con el examen rápido del portaobjetos. La proporción de células linfoides es un indicador importante del pronóstico en la leucemia linfocítica crónica[14]. Las células plasmáticas deben encontrarse en un porcentaje inferior al 2%; en las discrasias de las células plasmáticas, su número puede estar aumentado, pueden presentarse en agregados o tener un aspecto morfológico anómalo.
- Buscar áreas de necrosis de la médula ósea[15]. En las áreas necrosadas, las células se tiñen irregularmente, con contornos borrosos, encogimiento citoplasmático y picnosis nuclear. La necrosis de la médula ósea puede producirse en la enfermedad de las células falciformes; también, en ocasiones, en los linfomas, en la leucemia linfoblástica aguda y en la leucemia linfocítica crónica, en las enfermedades mieloproliferativas y en el carcinoma metastásico, así como en la septicemia, la tuberculosis y la anorexia nerviosa[16]. En pacientes con anorexia nerviosa o con caquexia puede haber una transformación gelatinosa de la sustancia de base de la médula[16].
- Valorar el contenido férrico de los macrófagos y buscar los gránulos de hierro en las células eritroides en un portaobjetos teñido con el colorante de Perls. Hay que examinar al menos siete grumos para valorar de forma óptima los depósitos de hierro en un aspirado de médula ósea[17]. Si se dispone de menos grumos, el diagnóstico de deficiencia de hierro sólo puede hacerse de forma provisional. En la anemia sideroblástica, los gránulos no rodean completamente el núcleo. También pueden observarse patrones anómalos de tinción de hierro en las anemias diseritropoyéticas, como las talasemias.

Informes de los resultados

Es útil hacer los informes sobre las extensiones de médula ósea en un formulario impreso en el que el informe y la conclusión estén dispuestos de forma organizada (fig. 6.6). Cuando se utiliza un sistema informatizado de elaboración de informes, resulta de utilidad tener una plantilla con encabezamientos para asegurarnos de que los informes de la médula son sistemáticos y coherentes. Hay que disponer de una relación codificada de los diversos comentarios descriptivos que puedan utilizarse para facilitar la entrada de los datos. Los resúmenes de los informes deben ser inteligibles para los clínicos que no son especialistas en hematología.

PREPARACIÓN DE CORTES DE GRUMOS DE ASPIRADO DE MÉDULA ÓSEA

Cuando no se pueda realizar una biopsia por trepanación (v. más adelante), se pueden fijar, teñir y examinar los pequeños grumos obtenidos por aspiración de la médula. Tales muestras son útiles para valorar la celularidad y para detectar granulomas y células tumorales. Si se necesitan cortes, es conveniente dejar que la médula aspirada residual coagule en una jeringa de plástico y desprender la muestra para que quede en el fijador una vez haya coagulado.

Apellido: _____ Nombre: _____ Sexo: ____ Fecha de nacimiento: _____

Especialista: _____

Fecha de la extracción: _____ N.° Hospital: _____ N.° Laboratorio: _____

Detalles clínicos:

Recuento leucocitario: Hb: VCM: Recuento plaquetario:

Extensión sanguínea:

Realizada por: Sitio de aspiración: Facilidad de la aspiración:

Partículas:

Celularidad: Cociente M:E

Eritropoyesis:

Granulopoyesis:

Megacariocitos:

Linfocitos:

Células plasmáticas:

Macrófagos:

Otras células:

Células blásticas	Promielocitos	Mielocitos y metamielocitos	Neutrófilos	Eosinófilos
Basófilos	Monocitos	Linfocitos	Células plasmáticas	Eritroides

Depósitos de hierro: Gránulos sideróticos:

Otras pruebas que se deben realizar:

Conclusión:

Autorizado por: Fecha:

Figura 6.6. Ejemplo de formulario de informe para las extensiones de médula ósea.

BIOPSIA POR TREPANACIÓN PERCUTÁNEA DE LA MÉDULA ÓSEA

Las biopsias por trepanación de la médula ósea tienen un valor incalculable para el diagnóstico de los trastornos en que no se obtiene muestra al aspirar la médula ósea (p. ej., mielofibrosis, infiltraciones, etc.) o cuando la arquitectura distorsionada de la médula es una característica diagnóstica importante (p. ej., enfermedad de Hodgkin, linfoma, etc.). Igual que los aspirados medulares, éstas se pueden realizar a la cabecera de la cama del enfermo o en departamentos ambulatorios. La espina ilíaca posterior es el sitio habitual, aunque también se puede utilizar la espina ilíaca anterior. Se considera que en la espina ilíaca posterior se pueden obtener muestras de mayor longitud y extensión y que la aspiración es menos incómoda para el paciente[18].

La muestra conseguida por trepanación se obtiene insertando la aguja de biopsia en el hueso y utilizando un movimiento de rotación hacia delante y hacia atrás para extraer un trozo de tejido. Los principales problemas de este método son el aplastamiento de la muestra, con la distorsión correspondiente de la arquitectura, y la dificultad para desprender el núcleo de hueso del interior del espacio medular. Las agujas de biopsia por trepanación, tanto si son reutilizables como desechables, están específicamente diseñadas para solventar estos problemas. La aguja Jamshidi tiene un extremo afilado para reducir el artefacto por aplastamiento (fig. 6.7) y el trépano Islam dispone de un dispositivo para sujetar el núcleo (fig. 6.8). Si se necesitan nuestras más amplias, se pueden utilizar agujas de trepanación con calibres de 4-5 mm. Otras agujas utilizadas en ocasiones para la obtención de muestras de biopsia por trepanación son la aguja de «microtrepanación» de 2 mm de calibre y la aguja de Vim-Silverman. Sin embargo, en comparación con otras agujas, éstas proporcionan muestras de médula más pequeñas con tendencia a romperse.

Para investigar la trombocitopenia y la neutropenia en los neonatos pequeños pretérmino, se pueden obtener cortes de médula ósea aspirada que permitan la valoración de la celularidad medular y de su arquitectura[19]. Se introduce una aguja Osgood[a], de 19G y de media pulgada, 2 cm por debajo de la tuberosidad tibial. Se retira el trocar y se avanza la aguja hueca con un movimiento de rotación 2-3 mm en el espacio medular. Se conecta una jeringa para aspirar a través de la aguja hasta que aparezca tejido medular; entonces se extraen la aguja y la jeringa. Se desprende suavemente el coágulo de la médula con la punta de una aguja y se coloca en el fijador. Se procesa la muestra como si fuera una biopsia de adultos con la excepción de que no se necesita descalcificarla.

Complicaciones de la biopsia de médula ósea

La biopsia de médula ósea es, en general, un procedimiento inocuo y sólo se producen sucesos adversos graves en menos del 0,05% de los procedimientos[20]. La complicación más habitual es el sangrado, que puede ocasionar una morbilidad significativa, como el «síndrome compartimental glúteo»[21] y muy raramente la muerte. El sangrado está relacionado más a menudo con una alteración de la función plaquetaria que con una trombocitopenia o con un defecto en los factores de coagulación[20].



Figura 6.7. **Trépano Jamshidi para la biopsia de la médula ósea.**

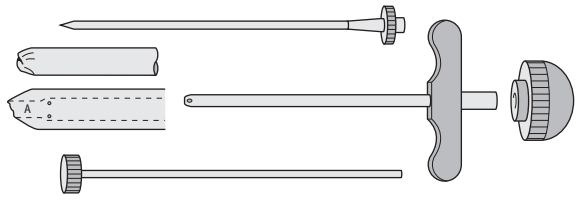


Figura 6.8. **Trépano Islam para la biopsia de la médula ósea.** El extremo cortante distal está conformado para sujetar el núcleo de forma segura durante la extracción del material.

Improntas de las muestras de biopsia de la médula ósea por trepanación

Cuando se obtiene una biopsia por trepanación, se pueden hacer improntas de la misma antes de transferir la muestra al fijador. Esto resulta particularmente útil si el aspirado de médula ósea no es adecuado. El núcleo óseo se golpetea suavemente o se hace rodar de un lado a otro del portaobjetos, fijándolo y tiñéndolo a continuación como los frotis de médula ósea (v. pág. 55). Así podemos examinar inmediatamente las células que se desprenden de la muestra en

[a] Popper y Sons, New Hyde Park, Nueva York.

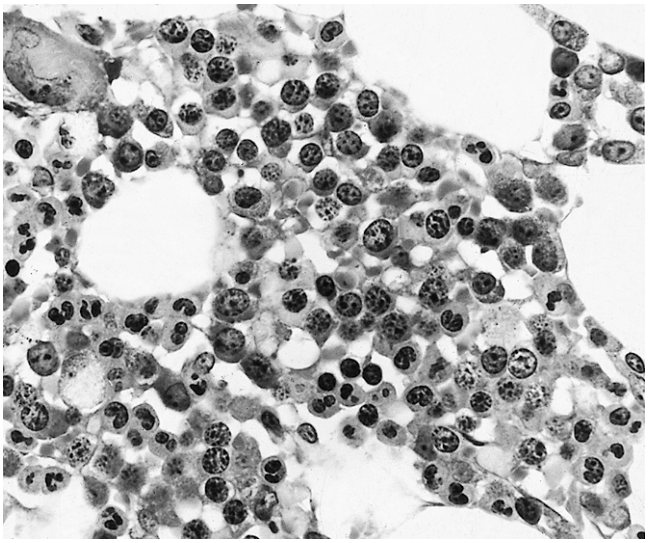


Figura 6.9. Microfotografía de un corte de la médula ósea. Biopsia de la cresta ilíaca. Inclusión en metacrilato. Leucemia mieloblástica. Teñida con May-Grünwald-Giemsa.

el portaobjetos y proporcionar un diagnóstico varios días antes de que se haya procesado la muestra de la biopsia por trepanación.

Tratamiento de las muestras de biopsia de médula ósea por trepanación

Hay que fijar la muestra en suero salino convencional al 10%, tamponado hasta un pH 7,0, durante 12-48 h antes de descalcificarlo, deshidratarlo e incluirlo en parafina con los procedimientos histológicos habituales. El encogimiento celular y la distorsión por el proceso de descalcificación pueden alterar los detalles de las células. Estas desventajas pueden solventarse con la inclusión en metilmetacrilato («plástico»). En el trabajo realizado por Bain y cols.[22] se pueden encontrar los detalles para la preparación de los cortes de las biopsias de médula ósea.

Tinción de los cortes de las muestras de biopsia de médula ósea por trepanación

Hay que teñir de forma rutinaria los cortes de médula ósea con hematoxilina y eosina (H&E) y con un método de impregnación argéntica para la reticulina. Los cortes pueden teñirse también con colorantes de Romanowsky, como el

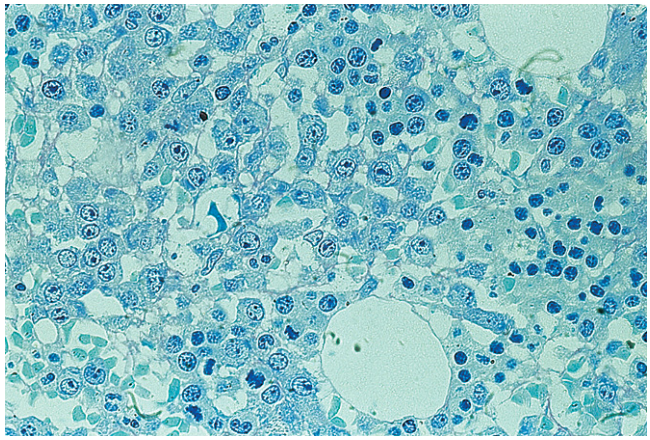


Figura 6.10. Microfotografía de un corte de médula ósea normal. Biopsia de la cresta ilíaca. Inclusión en metacrilato. Teñida con May-Grünwald-Giemsa.

May-Grünwald-Giemsa, y con la reacción de Perls para el hierro. La tinción con H&E es excelente para demostrar la celularidad y el patrón de la médula y para revelar los cambios patológicos, como fibrosis, o la presencia de granulomas o de células carcinomatosas. La figura 6.9 muestra el grado de variación de la celularidad de la médula en el individuo sano. Las células hemopoyéticas pueden ser identificadas más fácilmente en una preparación teñida con Romanowsky (figs. 6.10 y 6.11). Tanto las muestras incluidas en parafina como las incluidas en plástico son adecuadas para la inmunohistoquímica.

La impregnación argéntica tiñe la matriz glucoproteica, que está relacionada con el tejido conjuntivo. La médula ósea contiene siempre una pequeña cantidad de este material, al que nos referimos como «reticulina» y que es una forma precoz de colágeno. El contenido en reticulina de la médula ósea ilíaca se muestra en la figura 6.12. El incremento de la reticulina medular se manifiesta por un aumento en el número y grosor de las fibras. El aumento del depósito de reticulina se puede producir en los trastornos mieloproliferativos, sobre todo en aquéllos relacionados con la proliferación de megacariocitos, y en los trastornos linfoproliferativos, en el carcinoma secundario con infiltración de la médula ósea, en los trastornos óseos, como en el hiperparatiroidismo y en la enfermedad de Paget, y en las reacciones inflamatorias[23]. En la mielofibrosis o la mielosclerosis, se encuentra una forma de colágeno más «madura» que, a diferencia de la reticulina, es visible con la tinción de H&E (fig. 6.13).

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

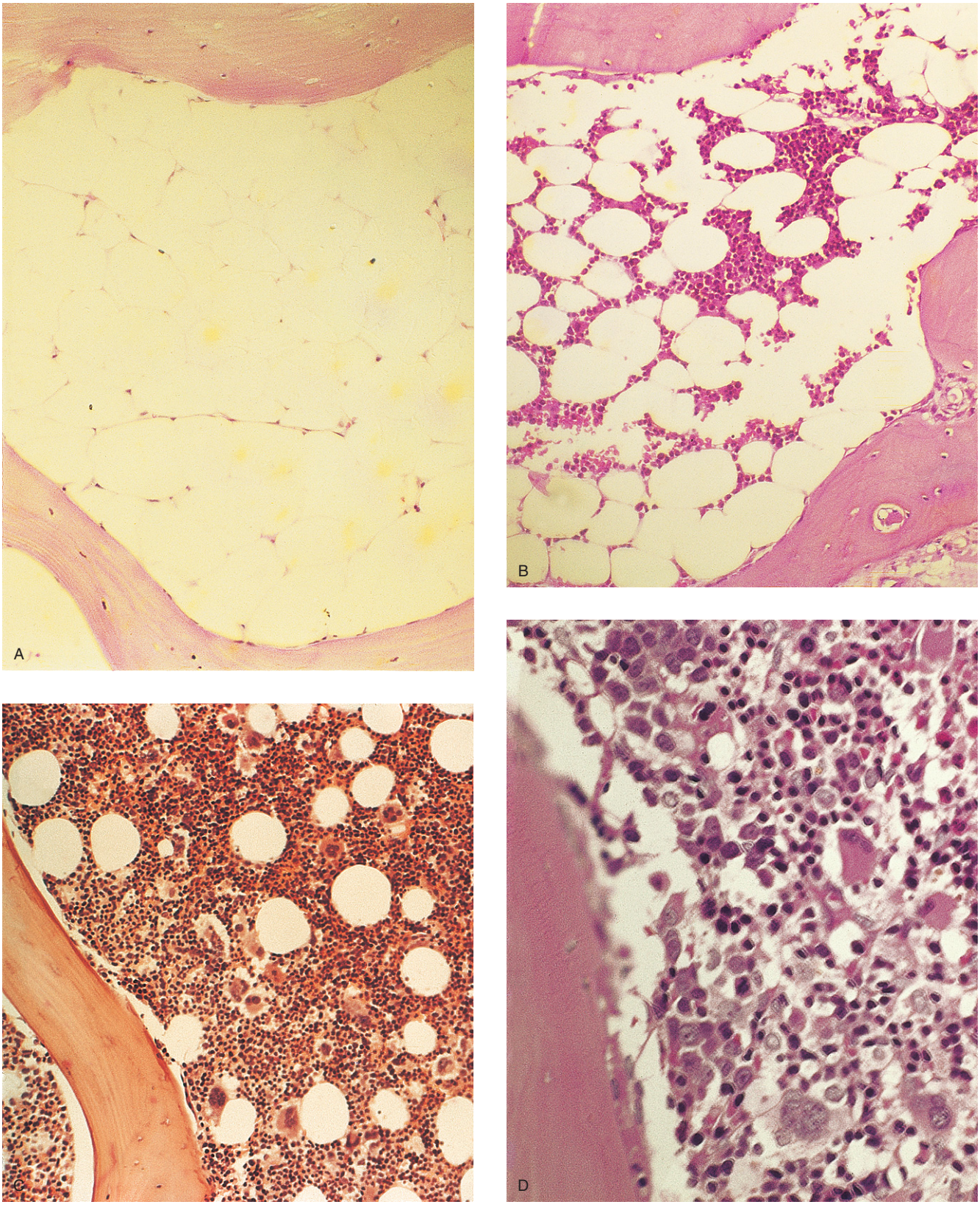


Figura 6.11. Microfotografía de cortes de la médula ósea. Médula ósea de la cresta ilíaca en la que se observa el rango de celularidad; A, hipocelular; B y C, celularidad normal, y D, hipercelular.

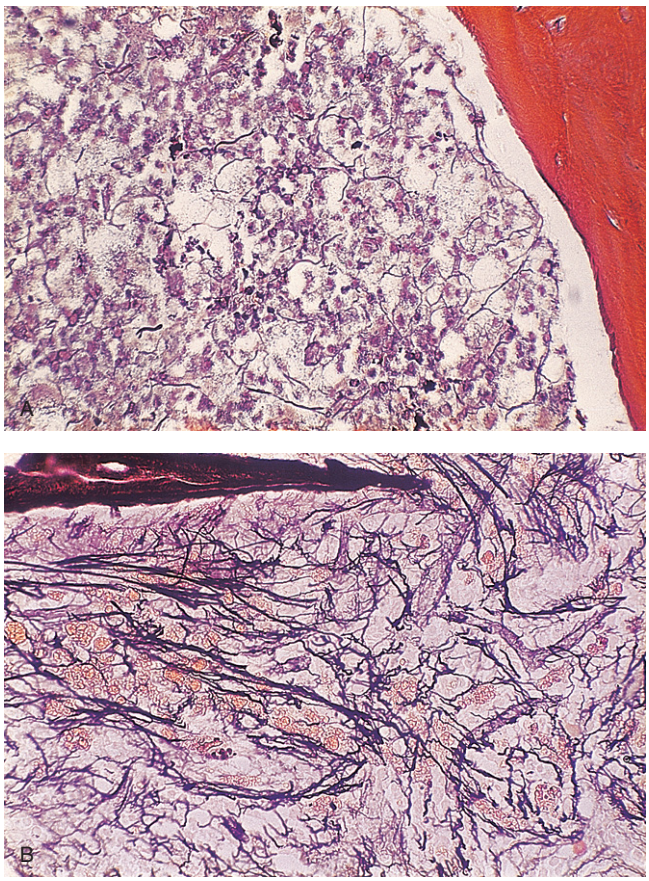


Figura 6.12. **Microfotografías de cortes de la médula ósea.** Biopsia de la cresta ilíaca. Teñida para ver la reticulina con el método de impregnación argéntica: A, normal, y B, mielofibrosis crónica.

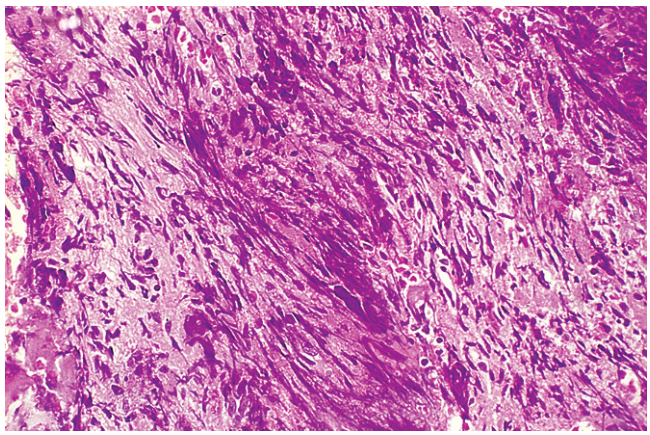


Figura 6.13. **Microfotografía de corte de la médula ósea.** Biopsia de la cresta ilíaca; proliferación de fibroblastos y de colágeno en un caso de mielofibrosis. Tinción con hematoxilina y eosina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bain BJ 2001 Bone marrow aspiration. Journal of Clinical Pathology 54:657-663.
2. Bain BJ 2001 Bone marrow trephine biopsy. Journal of Clinical Pathology 54:737-742.
3. Hall R. 2004 Results of bone marrow biopsy patient satisfaction survey at the Royal Bournemouth Hospital. British Journal of Haematology 125 (supp 1), Abstract 200, p. 62.
4. Marti J, Anton E, Valenti C 2004. Complications of bone marrow biopsy. British Journal of Haematology 124:555-563.
5. Devaliaf V, Tudor G. 2004 Bone marrow examination in obese patients. British Journal of Haematology 125:537-539.
6. Engeset A, Nesheim A, Sokolowski J 1979 Incidence of "dry tap" on bone marrow aspirations in lymphomas and carcinomas: diagnostic value of the small material in the needle. Scandinavian Journal of Haematology 22:417-422.
7. Ferrant A 1980 Selective hypoplasia of pelvic bone marrow. Scandinavian Journal of Haematology 25:12-18.
8. Jacobs P 1995 Choice of needle for bone marrow trephine biopsies. Hematology Reviews 9:163-168.
9. Fillola GM, Laharrague PF, Corberand JX 1992 Bone marrow enrichment technique for detection and characterization of scarce abnormal cells. Nouvelle Revue Française d'-Hématologie 34:337-341.
10. Hoffman SB, Morrow GW Jr, Pease GL, et al 1964 Rate of cellular autolysis in postmortem bone marrow. American Journal of Clinical Pathology 41:281-286.
11. Den Ottolander GJ 1996 The bone marrow aspirate of healthy subjects. British Journal of Haematology 95:574-575.
12. Bain B 1996 The bone marrow aspirate of healthy subjects. British Journal of Haematology 94:206-209.
13. Maeda K, Hyun BH, Rebuck JW 1977 Lymphoid follicles in bone marrow aspirates. American Journal of Clinical Pathology 67:41-48.
14. Rozman C, Montserrat E, Rodriguez-Fernandez JM et al 1984 Bone marrow histologic pattern: the best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia—a multivariate survival analysis of 329 cases. Blood 64:642-648.
15. Kiraly JF, Wheby MS 1976 Bone marrow necrosis. American Journal of Medicine 60:361-368.
16. Smith RRL, Spivak JL 1985 Marrow cell necrosis in anorexia nervosa and involuntary starvation. British Journal of Haematology 60:525-530.
17. Hughes DA, Stuart-Smith SE, Bain BJ 2004. How should stainable iron in bone marrow films be assessed? Journal of Clinical Pathology 57:1038-1040.
18. Hernándes-Garciá MT, Hernández-Nieto L, Pérez-González E et al 1993 Bone marrow trephine biopsy: anterior superior iliac spine versus posterior superior iliac spine. Clinical and Laboratory Haematology 15:15-19.
19. Sola M, Rimsza L, Christensen R 1999 A bone marrow biopsy technique suitable for use in neonates. British Journal of Haematology 107:458-460.
20. Bain B 2003 Bone marrow biopsy morbidity and mortality. British Journal of Haematology 121:949-951
21. Roth JS, Newman EC 2002. Gluteal compartment syndrome and sciatica after bone marrow biopsy: a case report and review of the literature. American Surgeon 68(9):791-794
22. Bain B, Clark DC, Lampert IO, Wilkins BS 2000 Bone marrow pathology, 3rd ed., Blackwell Science, Oxford.
23. McCarthy DM 1985 Fibrosis of the bone marrow: content and causes. British Journal of Haematology 59:1-7.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

7 Anemia ferropénica y sobrecarga de hierro

Mark Worwood

Metabolismo del hierro 113
Captación y liberación del hierro celular 115
Almacenamiento de hierro 115
Regulación del metabolismo del hierro 115
Transporte del hierro en el plasma 115
Estado del hierro 116
Trastornos del metabolismo del hierro 116
Métodos para valorar el estado del hierro 117
Ferritina sérica 117
Inmunoanálisis de la ferritina 117
Reactivos y materiales 117
Preparación y conservación de una solución estándar de ferritina 120
Procedimiento del ensayo 120
Selección de un método de ensayo 120
Interpretación 121
Cálculo de la concentración de hierro en el suero 122
Reactivos y materiales 122
Método 122
Cálculo 122
Procedimiento alternativo: hierro sérico sin precipitación de las proteínas 123
Reactivos y materiales 123
Método 123
Cálculos 123
Métodos automatizados 124
Concentraciones de hierro sérico en estado normal y en la enfermedad 124
Capacidad de fijación de hierro, transferrina sérica y saturación de la transferrina 124
Cálculo de la capacidad total de fijación de hierro 124
Método 124
Determinación de la capacidad de fijación insaturada del hierro 125
Reactivos y materiales 125
Método 125
Cálculos 125
Métodos completamente automatizados 126
Transferrina sérica 126
Rango normal de la transferrina y capacidad total de fijación de hierro 126
Saturación de la transferrina 126
Índice de la transferrina 126
Receptor de la transferrina sérica 127
Análisis del receptor de la transferrina sérica 127
Intervalos de referencia 127
Muestras 128
Concentraciones del receptor de la transferrina para el diagnóstico 128
Protoporfirina eritrocitaria 129
Analizadores 129
Aplicaciones diagnósticas 129
Unidades 129
Variabilidad metodológica y biológica de los análisis 129
Valor predictivo de los indicadores del metabolismo del hierro 131
Anemia ferropénica en los adultos 131
Detección del déficit de hierro en las enfermedades agudas o crónicas 131
Déficit de hierro en la lactancia y en la infancia 132
Embarazo 133
Conclusión 133

METABOLISMO DEL HIERRO

El contenido en hierro del organismo y su distribución entre las diversas proteínas se resume en la tabla 7.1. La mayor parte del hierro se encuentra en la proteína transportadora del oxígeno en los hematíes: la hemoglobina. El recambio metabólico del hierro está dominado también por la síntesis y la degradación de la hemoglobina. El grupo hemo se sintetiza en los hematíes nucleados en la médula ósea a través de una ruta que finaliza con la incorporación del hierro en la protoporfirina IX mediante la ferroquelatasa. La rotura del grupo hemo se produce en las células fagocíticas, principalmente en las del bazo, el hígado y la médula ósea. El hierro se libera del grupo hemo por la hemoxigenasa y se reutiliza en su mayor parte para sintetizar el hemo. Cada día se usan alrededor de 30 mg de hierro para fabricar nueva hemoglobina y la mayor parte de éste se obtiene de la lisis de los hematíes viejos.

La cantidad de hierro perdida por el organismo es relativamente pequeña (cerca de 1 mg/día en los hombres) y estas pérdidas no están influidas por el contenido en hierro del organismo ni por los requisitos de hierro del mismo. El con-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 7.1. Distribución del hierro en el organismo (hombre de 70 kg)

Proteína	Localización	Contenido en hierro (mg)
Hemoglobina	Hematíes	3.000
Mioglobina	Músculo	400
Citocromos y proteínas con hierro y azufre	Todos los tejidos	50
Transferrina	Plasma y líquido extravascular	5
Ferritina y hemosiderina	Hígado, bazo y médula ósea	100–1.000

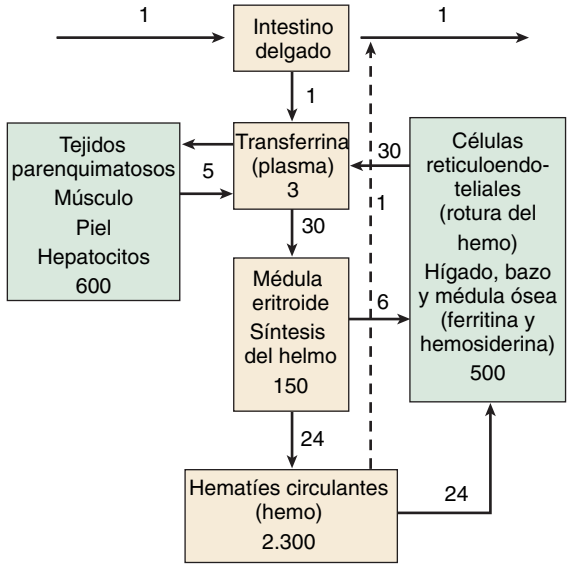


Figura 7.1. Intercambio de hierro en el organismo. Los números en los cuadros de texto se refieren a la cantidad de hierro (mg) en los diversos compartimentos y los números con las flechas indican la transferencia en mg/día. El hierro en los tejidos parenquimatosos es fundamentalmente hemo en el músculo y ferritina/hemosiderina en las células parenquimatosas hepáticas. La línea discontinua indica las pequeñas pérdidas de hierro (9,5 mg) en el intestino procedente de los hematíes; el resto de la pérdida de hierro se produce por la exfoliación de las células intestinales y por la bilis.

tenido en hierro del organismo se mantiene por la variación en la cantidad de hierro absorbido. En las mujeres, la menstruación y el parto incrementan las pérdidas de hierro en unos 2 mg/día. Es posible que la absorción de hierro no aumente lo suficiente para compensar estas pérdidas de hierro y este hecho puede finalmente conducir al desarrollo de una anemia ferropénica. En la mayoría de los hombres y de las mujeres posmenopáusicas existe cierto «depósito» de hierro. Es el hierro presente en la ferritina, o en su derivado insoluble, la hemosiderina, que está disponible para la síntesis del grupo hemo en caso de necesidad. En muchas mujeres jóvenes y en los niños el depósito de hierro es escaso o nulo.

La proteína fijadora del hierro, la transferrina, es responsable del transporte extracelular. La mayoría de las células obtienen el hierro a partir de la transferrina. El hierro se une a los receptores de la transferrina en la superficie celular, y a continuación, se produce una internalización en forma de vesículas con liberación de hierro en las células y devolución de la apotransferrina (la proteína sin hierro) al plasma para su reciclado (fig. 7.1).

Absorción del hierro de la dieta

La absorción del hierro[1] depende de la cantidad de hierro en la dieta, de su biodisponibilidad y de las necesidades de hierro del organismo. Una dieta occidental normal proporciona aproximadamente 15 mg diarios de hierro. De ese hierro, la digestión en la luz intestinal libera cerca de la mitad de forma soluble, de la cual únicamente alrededor de 1 mg (5-10% del hierro dietético) se transfiere a la sangre portal en un hombre adulto sano.

Factores dietéticos y luminales

La mayor parte del hierro dietético consiste en hierro no hemo derivado de los cereales (a menudo reforzados con hierro adicional), con un componente dietético menor, pero de mejor absorción, que proviene del hierro hemo de la carne y del pescado. En el déficit de hierro, la absorción máxima de hierro en una dieta occidental mixta no supera los 3-4 mg diarios. Esta cantidad es mucho menor en las dietas basadas en cereales, principalmente vegetarianas, de la mayoría de la población mundial.

El hierro no hemo se libera de los complejos proteínicos por la acción del ácido y las enzimas proteolíticas en el estómago y en el intestino delgado. La máxima absorción ocurre en el duodeno y es peor absorbido en el yeyuno, probablemente porque el ambiente cada vez más alcalino produce la formación de complejos de hidróxido férrico insoluble. Muchos factores luminales favorecen (p. ej., la carne y la vitamina C) o inhiben (p. ej., los fitatos y los taninos) la absorción de hierro no hemo. Las sales de hierro ferroso terapéuticas se absorben bien (10-20%) en el estómago vacío, pero cuando se toman con la comida, la absorción se reduce por las mismas interacciones dietéticas que afectan al hierro no hemo de los alimentos.

Absorción de hierro a nivel molecular

Se han identificado diversas proteínas de transporte a través de la membrana, proteínas reguladoras y oxidorreductasas asociadas relacionadas con el transporte de hierro a través de la célula intestinal. El hierro no hemo se libera de la comida como Fe^{3+} (hierro férrico) y se reduce a Fe^{2+} (hierro ferroso) por acción de la Dctyb, una ferrirreductasa unida a la membrana. El hierro es transportado a través del borde en cepillo de la membrana por la proteína transportadora del metal: DMT1. Parte del hierro se incorpora a la ferritina y se pierde cuando las células se descaman. El hierro destinado a ser retenido en el organismo es transportado a través de la membrana serosa por la ferroportina 1. Antes de su captación por la transferrina, el Fe^{2+} se oxida en Fe^{3+} por la acción de la hefaestina (una proteína de membrana homóloga a la proteína plasmática ceruloplasmina que contiene cobre) o de la ceruloplasmina plasmática.

La hemoglobina y la mioglobina son digeridas en el estómago y en el intestino delgado. El grupo hemo es captado inicialmente por los receptores del hemo en la membrana con borde en cepillo y el hierro liberado intracelularmente por la hemoxigenasa antes de penetrar en el lábil depósito de hierro y seguir una ruta común con el hierro de origen no hemo.

Regulación de la absorción de hierro

La absorción de hierro puede regularse tanto en la etapa de la captación por la mucosa como en la etapa de la transferencia a la sangre. A medida que las células epiteliales se desarrollan en las criptas de Lieberkuhn, su contenido en hierro refleja el valor del hierro plasmático (saturación de la transferrina) y sirve para programar a las células para que absorban hierro consecuentemente según van diferenciándose a lo largo de las vellosidades. La transferencia al plasma depende de los requisitos en hierro del eritrón y del nivel de los depósitos férricos[2]. Esta regulación se realiza directamente a través de la hepcidina, un péptido sintetizado en el hígado en respuesta al hierro y a la inflamación[3].

Captación y liberación del hierro celular[4]

La transferrina se une al receptor de la transferrina (RTf) que recubre la célula. Las dos proteínas se unen fuertemente para formar un complejo de alta afinidad, que inicia la endocitosis de la membrana local. El endosoma resultante contiene al complejo transferrina-receptor de la transferrina. El pH del endosoma se reduce a continuación por una bomba de protones para inducir un cambio adaptativo en la holotransferrina, que libera su contenido en hierro. El hierro es transportado al interior de la célula por la DMT1. Este hierro se almacena a continuación como ferritina o se utiliza en el interior de la célula (p. ej., para la síntesis de hemoglobina en los precursores eritroides). La apotransferrina y el receptor de la transferrina regresan a la superficie celular donde se disocian a pH neutro de forma que el ciclo pueda comenzar de nuevo.

Los macrófagos reticuloendoteliales desempeñan un papel fundamental para el reciclado del hierro resultante de la degradación de la hemoglobina de los hematíes senescentes. Engloban los hematíes y liberan el hierro sin utilizar la hemoxigenasa. El hierro es rápidamente cedido a la transferrina plasmática o almacenado como ferritina. Poco se conoce sobre el mecanismo de la liberación, pero es posible que la ferroportina 1 sea un componente esencial.

Almacenamiento del hierro

Todas las células necesitan hierro para la síntesis de proteínas pero tienen también la capacidad de almacenar el hierro en exceso[5]. Hay dos formas de almacenar hierro: una forma soluble, conocida como ferritina, y una insoluble, la hemosiderina. La ferritina es una proteína esférica (masa molecular, 480.000) que encierra un núcleo de fosfato hidróxido de hierro, que puede contener hasta 4.000 átomos de hierro. La hemosiderina es una forma degradada de la ferritina, cuya cubierta proteica está parcialmente degenerada, lo que permite que se agreguen los núcleos de hierro. Los depósitos de hemosiderina se visualizan fácilmente con la ayuda de un microscopio óptico como áreas de positividad del azul de Prusia tras la tinción de cortes del tejido con ferrocianuro potásico en ácido (v. pág. 267). La ferritina se encuentra en todas las células y en mayor concentración en el hígado, el bazo y la médula ósea.

Regulación del metabolismo del hierro

La expresión de determinadas proteínas férricas implicadas tanto en el transporte como en el almacenamiento está ampliamente controlada por regulación postranscripcional por las proteínas reguladoras del hierro (IRP 1 y 2, del inglés *iron regulatory proteins*)[4]. La conformación de estas proteínas citosólicas ligadas al ARN está directamente influenciada por la cantidad de hierro en el interior de la célula y, en consecuencia, inhiben o favorecen la traducción de diversas proteínas contenedoras de hierro, regulando de ese modo su expresión.

Cuando el depósito lábil de hierro es deficitario, la IRP tiene un centro de unión abierto para los elementos respondedores al hierro (IRE, del inglés *iron responsive elements*) presentes en el ARN mensajero (ARNm) de algunas proteínas férricas. Los IRE consisten en un tallo de bases apareadas interrumpido por una citosina no apareada, seguido por un tallo más arriba de cinco bases apareadas y un bucle de seis elementos. Cuando el depósito lábil de hierro se encuentra saturado, el hierro se une a la IRP 1 para producir un grupo 4Fe-4S, que bloquea el centro de unión del IRE e impide que el IRP se una al IRE. En presencia de hierro, la IRP 2 (que no es una proteína con Fe-S) se degrada.

Las diferentes proteínas férricas están reguladas por las IRP de diversas formas, dependiendo de dónde se localicen los IRE. Si el IRE está en la 3' UTR del ARNm, la unión con la IRP estabilizará la translación protegiendo el producto translacional de la degradación endonucleolítica (receptor de la transferrina y DMT1). Si el IRE está en la 5' UTR del ARNm, la unión con la IRP inhibirá la traslación del ARNm. Ambas subunidades de ferritina tienen un IRE en la 5' UTR. Cuando el hierro es abundante, la IRP no se une al 5' IRE y así la expresión de la ferritina no está inhibida y el exceso de hierro puede almacenarse de forma adecuada. Cuando el hierro escasea, la IRP se une al IRE e inhibe la síntesis de ferritina.

Transporte del hierro en el plasma

Casi todo el hierro en el plasma está estrechamente unido a la transferrina. El suministro a las células necesita la unión específica con los receptores de la transferrina. El depósito de hierro en el plasma (hierro unido a la transferrina) es de aproximadamente 3 mg, aunque el recambio metabólico diario supera los 30 mg. Además, hay otras proteínas que transportan cantidades más pequeñas de hierro en el plasma.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

La *haptoglobina*[6] es una glucoproteína sérica que se une ávidamente a la hemoglobina liberada en la corriente sanguínea durante la hemólisis. El complejo hemoglobina-haptoglobina es eliminado rápidamente del plasma por un receptor específico, el CD163, que está muy expresado en los macrófagos tisulares[7].

La *hemopexina*[8] es una glucoproteína plasmática con una masa molecular aproximada de 60 kDa que se une al hemo y lo transporta a las células mediante un proceso que conlleva una endocitosis mediada por el receptor de la hemopexina y el reciclado de la proteína intacta.

En estado normal, las concentraciones de *ferritina* en plasma son bajas y reflejan el nivel de los depósitos de hierro en el organismo. La mayor parte de esta ferritina parece estar glucosilada y tener un contenido relativamente bajo en hierro[9]. Dicha ferritina tiene una supervivencia bastante prolongada en la sangre ($T_{1/2}$ del orden de 30 h). La ferritina se libera también en la circulación como resultado del daño tisular (de forma más notable tras la necrosis hepática). La ferritina tisular se elimina rápidamente de la circulación ($T_{1/2}$ de aproximadamente 10 min) por la acción del hígado.

El hierro no-transferrina representa una forma de hierro no unido a esta proteína; tiene una masa molecular baja y puede ser ligado por quelantes específicos del hierro[10]. Se han descrito diversos análisis que han evidenciado dicha fracción en el plasma de pacientes con sobrecarga de hierro. La forma química de este hierro se desconoce, pero es posible que sea rápidamente eliminado de la circulación por el hígado.

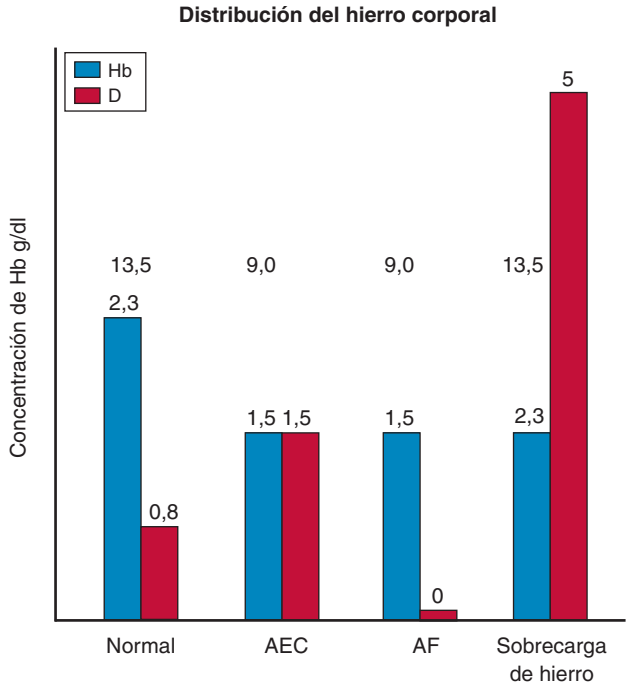


Figura 7.2. Distribución del hierro corporal. AEC, anemia por enfermedad crónica; AF, anemia ferropénica; D, hierro de depósito (ferritina y hemosiderina); Hb, hierro de la hemoglobina.

ESTADO DEL HIERRO

Un estado normal del hierro conlleva un nivel de eritropoyesis que no esté limitado por el suministro de hierro y la presencia de una pequeña reserva de «hierro de depósito» para hacer frente a las necesidades fisiológicas normales[11]. La capacidad para sobrevivir a una pérdida aguda de sangre (hierro) que pueda producirse por una lesión representa también una ventaja.

Los límites de la normalidad son difíciles de definir y algunos autores argumentan que la normalidad fisiológica consiste únicamente en la presencia de una cantidad mínima de hierro de depósito[12], aunque se comprenden a la perfección ambos extremos: la anemia ferropénica y la hemocromatosis.

Aparte de que en el organismo haya mucho o poco hierro, también existe la posibilidad de que esté mal distribuido (fig. 7.2). Un ejemplo es la anemia asociada con inflamación o con infección en la que se produce un fracaso parcial de la eritropoyesis y de la liberación de hierro desde las células fagocíticas del hígado, el bazo y la médula ósea, lo que se traduce en una acumulación de hierro en forma de ferritina y de hemosiderina en estas células. Así la determinación del estado de hierro requiere el cálculo de la cantidad de hierro en la hemoglobina (habitualmente medido por la concentración de hemoglobina [Hb] en sangre; v. cap. 3) y el nivel de hierro de depósito (medido por la concentración de ferritina sérica). Se debe sospechar el déficit de hierro en la anemia microcítica hipocrómica, aunque en las etapas iniciales del déficit de hierro los hematíes pueden ser normocíticos y normocrómicos. Otra característica del déficit de hierro es el aumento de la concentración de protoporfirina en los hematíes; normalmente, hay una pequeña cantidad, pero la síntesis defectuosa del hemo, causada por la falta de hierro, se traduce en la acumulación de una cantidad significativa (principalmente como protoporfirina de cinc) en los hematíes[13].

Algunas veces se requieren análisis adicionales. En la hemocromatosis genética, el atesoramiento precoz del hierro se anuncia por un aumento de la saturación de la transferrina. La concentración de ferritina sérica sólo aumenta en etapas posteriores a medida que se incrementa el nivel de hierro en depósito. En la anemia por enfermedad crónica, los pacientes pueden tener concentraciones de ferritina sérica normales, incluso en ausencia de depósitos de hierro en la médula ósea (v. págs. 269-270). En esta circunstancia, el análisis del receptor de la transferrina sérica puede detectar el déficit de hierro tisular.

TRASTORNOS DEL METABOLISMO DEL HIERRO

Los aspectos clínicos del metabolismo del hierro[14,15] se han revisado y resumido en la tabla 7.2. Se dispone de una guía sobre la hemocromatosis genética[16].

MÉTODOS PARA VALORAR EL ESTADO DEL HIERRO

Los métodos utilizados para valorar el nivel del estado del hierro se resumen en la tabla 7.3. Algunos no tienen una aplicación general pero tienen valor para la estandarización de los métodos indirectos. La determinación de la Hb y de los índices eritrocitarios se describe en el capítulo 3.

FERRITINA SÉRICA

Con la aceptación de que la pequeña cantidad de ferritina en el suero humano (15-300 µg/l en los varones sanos) refleja el depósito de hierro en el organismo, se ha adoptado ampliamente la medida de la ferritina sérica como prueba para el déficit y la sobrecarga de hierro. El primer método fiable introducido fue un análisis inmunorradiométrico[17] en el que anticuerpos en exceso marcados con un isótopo radiactivo reaccionaban con la ferritina y los anticuerpos no unidos a la ferritina se eliminaban con un inmunoabsorbente. Este análisis fue sustituido por el análisis inmunorradiométrico con dos uniones[18], que proporciona mayor sensibilidad y comodidad. Desde entonces, el principio de este análisis se ha extendido al marcado no radiactivo, incluyendo las enzimas (análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas o ELISA). La mayoría de los sistemas actuales de inmunoanálisis de los laboratorios clínicos incluyen la ferritina en su repertorio de análisis. Los factores que deben considerarse al seleccionar un sistema de inmunoanálisis se analizan más adelante. El método descrito en la siguiente sección es un ELISA. El equipamiento más sofisticado que se necesita consiste en un lector de placas de microtitulación.

Tabla 7.2. Trastornos del metabolismo del hierro

Déficit de hierro
Ingesta deficiente
Dieta de baja biodisponibilidad
Requisitos fisiológicos aumentados
Crecimiento rápido al inicio de la niñez y en la adolescencia
Pérdida sanguínea
Fisiológica (p. ej., la menstruación)
Patológica (p. ej., gastrointestinal)
Malabsorción de hierro
Secreción reducida de ácido gástrico (p. ej., tras una gastrectomía parcial)
Reducción del área de absorción duodenal (p. ej., en la enfermera celíaca)
Redistribución del hierro
Acumulación de hierro en los macrófagos
Enfermedades inflamatorias, infecciosas o malignas («anemia por enfermedad crónica»)
Sobrecarga de hierro
Aumento de la absorción de hierro
Hemocromatosis hereditaria: generalmente homocigosidad para el HFE C282Y pero algunas veces afectando a otros genes
Eritropoyesis ineficaz masiva (p. ej., síndromes talasémicos graves, anemias sideroblásticas)
Sobrecarga de hierro subsahariana («siderosis Bantú»); solamente en combinación con un aumento del hierro dietético
Otros trastornos hereditarios raros (p. ej., atransferrinemia congénita)
Terapia inadecuada de hierro (rara)
Transfusiones sanguíneas múltiples en anemias refractarias
Talasemia mayor
Anemia aplásica
Síndromes mielodisplásicos

INMUNOANÁLISIS DE LA FERRITINA

Reactivos y materiales

Ferritina

La ferritina puede prepararse a partir de hígado o de bazo humanos, cargados con hierro y obtenidos en el momento de intervención quirúrgica (bazo) o *post mortem*. Hay que conseguir el permiso del paciente o de los familiares del paciente para utilizar el órgano en la preparación de la ferritina. El tejido se debe obtener tan pronto como sea posible tras el fallecimiento, y puede almacenarse a –20 °C durante 1 año. Hay que tener presente el riesgo de infección al manejar tejidos y extractos. La ferritina se purifica por métodos que aprovechan su estabilidad a 75 °C. La purificación posterior se obtiene por precipitación en una solución de sulfato de cadmio y por cromatografía de filtración en gel[19]. Hay que valorar su pureza mediante la electroforesis en gel de poliacrilamida[20] y determinar el contenido de proteína con el método de Lowry y cols. descrito por Worwood[20]. La ferritina humana puede almacenarse hasta 3 años a 4 °C a concentraciones de 1-4 mg de proteína/ml, en presencia de azida sódica como conservante. Estas soluciones no deben congelarse. La ferritina de hígado o de bazo humano se puede obtener de diferentes proveedores de reactivos de laboratorio. Puede utilizarse como estándar tras su calibración contra el estándar internacional (v. más adelante).

Anticuerpos contra la ferritina humana

Los anticuerpos adecuados son los de alta afinidad para la ferritina del hígado o del bazo humanos. Se pueden generar anticuerpos policlonales en conejos o en ovejas por los métodos convencionales[21] y comprobar su dosificación por precipitación con ferritina humana[20]. Se necesita una fracción de antisuero enriquecido con inmunoglobulina G (IgG) para el marcado enzimático en el análisis. El método más sencillo consiste en precipitar la IgG con sulfato de amonio[22]. También son adecuados los anticuerpos monoclonales específicos para la subunidad «L» rica en ferritina (ferritina de hígado o de bazo). Se pueden obtener los anticuerpos apropiados (incluyendo una preparación marca-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 7.3. Evaluación del estado del hierro corporal y factores de confusión

Medición	Intervalo de referencia (adultos)	Utilidad diagnóstica	Factores de confusión
Concentración de hemoglobina	H 13–17 g/dl M 12–15 g/dl	Definición de la anemia y valoración de su gravedad; la respuesta a un ensayo terapéutico con hierro confirma la anemia ferropénica	Otras causas de anemia además del déficit de hierro.
Índices eritrocitarios Volumen corpuscular medio Hemoglobina corpuscular media	 83–101 fl 27–32 pg	Los valores bajos indican una eritropoyesis deficiente por el hierro	Puede estar reducida en trastornos de la síntesis de hemoglobina diferentes del déficit de hierro (talasemia, anemias sideroblásticas, anemia por enfermedad crónica)
Suministro de hierro a los tejidos			
Hierro sérico[b]	10–30 µmol/l	Valores bajos en el déficit de hierro, valores elevados en la sobrecarga de hierro	Reducido en la enfermedad aguda y crónica; lábil, la utilización de la muestra matutina en ayunas reduce la variabilidad
Capacidad total de fijación de hierro (TIBC)[b]	47–70 µmol/l	Valores elevados característicos del déficit de hierro tisular. Valores bajos en la sobrecarga de hierro. También puede calcularse a partir de la concentración de la transferrina (Tf g/l × 25)	Raramente utilizado por sí mismo. No se dispone de rangos de referencia fiables
Saturación de la transferrina (ST) [hierro/TIBC × 100]	16–50%	Valores bajos en el déficit de hierro, valores elevados en la sobrecarga de hierro. La ST elevada es un indicador precoz de la acumulación de hierro en la hemocromatosis genética	Véase hierro sérico (arriba)
Suministro de hierro a la médula ósea			
Receptor sérico de la transferrina (RsTf) Protoporfirina de cinc eritrocitaria (PPC) Ferritina eritrocitaria (tipo «L») % Hematíes hipocrómicos	2,8–8,5 mg/l[a] <80 µmol/mol Hb 3–40 ag/cél <6%	La reducción de la ferritina eritrocitaria, y el aumento de PPC, RsTf y del % de hematíes hipocrómicos indican un aporte de hierro alterado a la médula ósea. Útil para identificar el déficit precoz de hierro y, con la medición de los depósitos de hierro, distinguirlo de la anemia por enfermedad crónica (AEC). En la AEC, el RsTf sólo aumenta en presencia de déficit de hierro tisular	La concentración de RsTf relacionada con la extensión de la actividad eritroide así como con el aporte de hierro a las células, la PPC, la ferritina eritrocitaria y el % de células hipocrómicas son medidas estables determinadas en el momento de la formación eritrocitaria. Es posible que los valores no reflejen el estado actual del hierro. Pueden estar aumentados por otras causas de incorporación alterada de hierro al hemo (anemias sideroblásticas, intoxicación por plomo, inflamación)
Depósitos de hierro			
Ferritina sérica	H 15–300 µg/l M 15–200 µg/l	Correlacionada con los depósitos de hierro en el organismo, desde el déficit hasta la sobrecarga	Aumentada: como proteína de fase aguda y por liberación de la ferritina tisular tras daño orgánico (sobre todo en las hepatopatías) Reducida: déficit de vitamina C
Hierro en biopsia tisular			
Hígado (análisis químico)	3-33 µmol/g peso seco	Confirmación de la sobrecarga de hierro	Posibilidad de error de muestreo en la biopsia por aguja cuando <0,5 mg o el hígado sea nodular

(Continúa)

Tabla 7.3. Evaluación del estado del hierro corporal y factores de confusión *(cont.)*

Medición	Intervalo de referencia (adultos)	Utilidad diagnóstica	Factores de confusión
Médula ósea (tinción de Perls)	(Grado)	Valorado como ausente, presente o aumentado. Utilizado sobre todo para diferenciar la AEC de la anemia ferropénica	Es necesaria una muestra adecuada
Flebotomía cuantitativa	<2 g Fe	Tratamiento de la hemocromatosis genética	
Fe quelable en orina (tras inyección intramuscular de desferoxamina)	<2 mg/24 h	Raramente utilizado pero puede confirmar la sobrecarga de hierro	
Técnicas de imagen			
RM (resonancia magnética)		Cada vez más utilizada tanto para los depósitos de hierro hepáticos como cardíacos	Se dispone de aparatos pero se necesitan análisis y programas especiales
SQID (dispositivo superconductor de interfaz cuántica, del inglés *superconducting quantum interface device*)[111]		Cuantificación de la sobrecarga de hierro hepática utilizando las propiedades magnéticas del hierro	No disponible en el Reino Unido

Adaptado de Pippard[126].
[a] Unidades e intervalos de referencia específicos del método.
[b] En el capítulo 2, tabla 2.2, se dan valores ligeramente diferentes.

da con peroxidasa de rábano) de Dako Ltd., High Wycombe, Bucks, Reino Unido.

Conjugación del preparado de IgG antiferritina con la peroxidasa de rábano[23]

1. Disolver 4 mg de peroxidasa de rábano (tipo Sigma VI P-8375) en 1 ml de agua y añadir 200 µl de una solución recién preparada de peryodato sódico 0,1 mol/l. La solución debe tomar una coloración marrón verdosa. Mezclarla suavemente por inversión y dejarla durante 20 min a temperatura ambiente, mezclándola suavemente cada 5 min. Dializar durante toda la noche contra 1 mmol/l de tampón de acetato sódico a un pH de 4,4.
2. Añadir 20 µl de tampón de carbonato sódico 0,2 mol/l, con pH 9,5, a una solución de antiferritina con fracción IgG (8 mg en 1 ml). Añadir 20 µl de tampón de carbonato sódico 0,2 mol/l, con pH 9,5, a la solución de peroxidasa de rábano para aumentar el pH hasta 9,0-9,5 y mezclar inmediatamente las dos soluciones. Dejarlas a temperatura ambiente durante 2 h y mezclarlas por inversión cada 30 min.
3. Añadir 100 µl de una solución recién preparada de borohidruro de sodio (4 mg/ml en agua) y dejarla a 4 °C durante 2 h. Dializar durante toda la noche contra 0,1 mol/l de tampón borato a pH 7,4.
4. Añadir un volumen igual de glicerol al 60% en tampón borato a la solución conjugada y conservar a 4 °C.

Tampón A

Salino tamponado con fosfato a pH 7,2 y con 0,05% de Tween 20. Preparar una solución de reserva concentrada ×10 (1,5 mol/l) disolviendo 80 g de cloruro sódico, 2 g de cloruro potásico, 11,5 g de fosfato disódico anhidro y 2 g de fosfato de potasio anhidro (KH_2PO_4) en 1 l de agua. Conservar a temperatura ambiente. Preparar el tampón A diluyendo 100 ml de la solución de reserva en agua hasta 1 l y añadir 0,5 ml de Tween 20. Conservar a 4 °C hasta un máximo de 2 semanas.

Tampón B

Prepararlo disolviendo 5 g de albúmina de suero bovino (ASB; Sigma A-7030) en 1 l de tampón A. Conservar a 4 °C hasta un máximo de 2 semanas.

Tampón C

Tampón carbonato, 0,05 mol/l, pH 9,6. Disolver 1,59 g de carbonato de sodio y 2,93 g de bicarbonato sódico en 1 l de agua y conservar a temperatura ambiente.

Tampón D

Tampón citrato fosfato, 0,15 mol/l, pH 5,0. Disolver 21 g de ácido cítrico monohidrato en 1 l de agua y conservar a 4 °C. Disolver 28,4 g de fosfato disódico anhidro en 1 l de agua y conservar a temperatura ambiente. Preparar un tampón fresco el día de la prueba mezclando 49 ml de solución de ácido cítrico con 51 ml de solución fosfato.

Solución sustrato

Debe prepararse justo antes de su uso añadiendo 33 µl de peróxido de hidrógeno al 30% a 100 ml del tampón D mezclándolos bien. Añadir 1 tableta que contenga 30 mg de diclorhidrato de *o*-fenilendiamina (Sigma P 8412) y mezclar.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Ácido sulfúrico
Comprar como solución 4M.

Preparación y conservación de una solución estándar de ferritina

Diluir una solución de ferritina humana en agua hasta aproximadamente 200 µg/ml. Medir la concentración de proteína con el método de Lowry tras haberla diluido hasta 20-50 µg/ml. Después diluir la solución de ferritina (aproximadamente 200 µg/ml) hasta una concentración de 10 µg/ml en una solución de barbital sódico 0,05 mol/l que contenga 0,1 mol/l de NaCl, 0,02% de NaN_3 y ASB (5 g/l) y que esté ajustada a un pH de 8,0 con HCl 5 mol/l. Repartir 200 µl en 200 tubos pequeños de plástico, cerrarlos herméticamente y conservarlos a 4 °C hasta un máximo de 1 año. Para utilizarlo, diluirlo en el tampón B hasta 1.000 µg/l y a continuación preparar diversas soluciones estándar entre 0,2 y 25 µg/l. Calibrar este estándar operativo contra el estándar de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el análisis de la ferritina sérica 94/572, que es la ferritina recombinante humana tipo L. Información en www.nibsc.ac.uk.

Revestimiento de las placas
Se necesitan placas de microtitulación (de 96 pocillos) para el inmunoanálisis. No utilizar los pocillos exteriores hasta que se haya establecido el procedimiento de análisis y se pueda comprobar que todos los pocillos dan resultados coherentes. Recubrir las placas añadiendo a cada pocillo 200 µl de la preparación de IgG antiferritina diluida hasta 2 µl/ml en el tampón C. Tapar la placa y dejarla durante toda la noche a 4 °C. El día del análisis, vaciar los pocillos invirtiendo la placa de forma brusca y secarlos con un ligero golpeteo, durante un corto período de tiempo, sobre toallitas de papel. Bloquear los sitios que no hayan reaccionado añadiendo 200 µl de ASB 0,5% (p/v) en el tampón C. Tras 30 min a temperatura ambiente, lavar cada placa tres veces rellenando cada pocillo con tampón A (utilizando una jeringa y una aguja) y vaciándola y escurriéndola como se ha descrito antes. Las placas pueden ser conservadas, secas, a 4 °C hasta un máximo de 1 semana.

Preparación de los sueros de prueba
Extraer sangre venosa y separar el suero. Las muestras se pueden guardar durante 1 semana a 4 °C o durante 2 años a –20 °C. También es apropiado el plasma obtenido con el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o la sangre heparinizada. Para el análisis, diluir 50 µl de suero en tampón B hasta 1 ml. Si es necesario, se pueden hacer diluciones adicionales en el mismo tampón.

Procedimiento del ensayo

Se recomienda la utilización de una pipeta multicanal para la adición rápida de las soluciones. Hay que añadir a cada placa las soluciones estándar y el suero, por duplicado, antes de 20 min.

Añadir 200 µl de solución estándar de suero diluido a cada pocillo. Cubrir la placa y dejarla a temperatura ambiente en un soporte sin corrientes de aire y sin que le dé la luz directa del sol durante 2 h. Vaciar los pocillos invirtiendo bruscamente la placa y dejarlos escurrir de pie sobre toallitas de papel con un golpeteo ocasional durante 1 min. Lavar tres veces rellenando cada pocillo con tampón A, dejándolo durante 2 min a temperatura ambiente y escurriéndolos como se ha descrito antes. Diluir el conjugado en ASB al 1% en el tampón A. La dilución óptima (del orden de 10^3-10^4 veces) debe verificarse mediante experimentación. Añadir 200 µl del conjugado de peroxidasa diluida de rábano picante a cada pocillo y dejar la placa cubierta durante otras 2 h a temperatura ambiente. Lavar tres veces con tampón A. Añadir 200 µl de la solución sustrato a cada pocillo. Incubar la placa durante 30 min en la oscuridad. Detener la reacción añadiendo 50 µl de ácido sulfúrico 4M a cada pocillo. Leer la absorbancia a 492 nm antes de 30 min, utilizando un lector de placas de microtitulación. Como alternativa, transferir 200 µl de cada pocillo a un tubo que contenga 800 µl de agua y leer la absorbancia en un espectrofotómetro.

Cálculo de los resultados
Calcular la absorbancia media en cada punto de la curva estándar y representarla contra la concentración de ferritina utilizando un papel semilogarítmico. Leer las concentraciones para los sueros a partir de esta curva. Si los resultados se guardan en un archivo y se calculan con un programa informático, el gráfico log-logit proporciona una respuesta lineal a las dosis. Para concentraciones de ferritina sérica superiores a los 200 µg/l, repetir el análisis a una dilución de 100 veces o mayor. En cada análisis hay que incluir sueros de control.

Selección de un método de ensayo

Las siguientes notas pueden ser de utilidad para aquellos que están considerando la introducción de un análisis de ferritina en un laboratorio clínico utilizando un sistema de inmunoanálisis.

1. *Límite de detección*. En algunos radioinmunoanálisis iniciales, el límite de detección se aproximaba a los 10 µg/l, lo que causó dificultades para utilizar el análisis para la detección del déficit de hierro. La mayoría de los análisis actuales tienen un límite inferior de cerca de 1 µg/l.
2. *El «gancho de la concentración elevada»*. Éste es un problema característico de los análisis con anticuerpos marcados, sobre todo de los análisis inmunorradiométricos en dos uniones[24]. Hace que los sueros con concentraciones de ferritina muy elevadas den lecturas anómalas en la parte inferior de la curva estándar. La mayoría de los análisis comerciales actuales no presentan este efecto. Dado el amplio intervalo de las concentraciones de ferritina sérica que pueden encontrarse en los pacientes hospitalizados (0-40.000 µg/l), es una buena práctica diluir y repetir el análisis de cualquier muestra

que dé lecturas mayores que el intervalo de trabajo del análisis.

3. *Interferencia de las proteínas no ferritina en el suero.* Ésta se puede producir con cualquier método, pero sobre todo con el análisis mediante anticuerpos marcados. Las proteínas del suero pueden inhibir la unión de la ferritina a la fase sólida cuando se compara con la unión en la solución tampón aislada. Dicho efecto puede evitarse diluyendo los estándares en un tampón que contenga un suero adecuado o diluyendo las muestras de suero tanto como sea posible. Por ejemplo, en el análisis descrito anteriormente, la muestra se ha diluido 20 veces con el tampón. Otra causa de error, difícil de detectar, es la interferencia con los anticuerpos anti-Ig[25]. Estos anticuerpos se unen a las inmunoglobulinas animales utilizadas para detectar el antígeno y formar artefactos en forma de «sándwiches». Tales anticuerpos se encuentran en cerca del 10% de los pacientes y de los sujetos normales. La interferencia puede reducirse añadiendo las especies apropiadas de inmunoglobulinas animales para bloquear la reacción cruzada, pero esto no siempre tiene éxito[26]. Una solución es utilizar anticuerpos de diferentes especies como fase sólida y anticuerpos marcados. De esta forma, se puede utilizar una antiferritina de conejo policlonal para revestir las placas en el ELISA con una antiferritina de oveja policlonal marcada con peroxidasa de rábano picante como segundo anticuerpo. El suero de conejo (0,5%) sustituye a la ASB en el tampón B.
4. *Reproducibilidad.* La mayoría de los análisis son satisfactorios. Con los análisis de las placas de microtitulación puede haber efectos «marginales» (diferencias entre las lecturas de los pocillos interiores y exteriores).
5. *Dilución de las muestras de suero.* Hay que establecer como norma que tanto las muestras estándar como las del suero se diluyan en paralelo por un factor aproximado de 100.
6. *Exactitud.* Se recomienda la utilización de la preparación estándar de ferritina de la OMS (v. antes la argumentación).

Existen informes de evaluación de la U.K. Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency (MHRA; anteriormente Medical Devices Agency) para los siguientes sistemas: Abbott IMx, Abbott AxSYM y Chiron ACS:180 (MDA/97/41); Roche Elecsys 2010 (MDA/98/56) y Wallac Auto DELFIA (MDA/00/32) Beckman Coulter Access (MDA/00/18). Todos ellos proporcionan análisis excelentes para la ferritina sérica. La tecnología se está desarrollando rápidamente, por lo que no se dispone de informes para los equipos recién introducidos.

Interpretación

El uso de la ferritina sérica para la valoración de los depósitos de hierro está muy consolidado[27]. En la mayoría de los adultos normales, las concentraciones de ferritina sérica se encuentran en el intervalo de los 15-300 µg/l. Durante los primeros meses de vida, las concentraciones medias de ferritina sérica varían considerablemente, reflejando los cambios en la concentración de los depósitos de hierro. Las concentraciones son menores en los niños (<15 años) que en los adultos y, desde la pubertad hasta la edad media, superiores en los hombres que en las mujeres. En los adultos, las concentraciones de menos de 15 µg/l indican una ausencia de depósitos de hierro. Los intervalos de referencia mencionados por los fabricantes de los equipos de reactivos varían y esto se debe, en parte, a la selección de los sujetos «normales». Algunas veces se incluyen sujetos con déficit de hierro y otras se excluyen. La interpretación de la concentración sérica en muchos trastornos patológicos no es tan directa, aunque las concentraciones inferiores a los 15 µg/l indican una depleción de los depósitos de hierro. En los niños, los niveles medios de los depósitos de hierro son menores y se ha observado que el umbral adecuado para detectar el déficit de hierro[28] es el de 12 µg/l.

La sobrecarga de hierro produce concentraciones elevadas de ferritina sérica, aunque éstas pueden encontrarse también en pacientes con hepatopatías, infecciones, inflamaciones o enfermedades malignas. Hay que considerar con cuidado la situación clínica antes de llegar a la conclusión de que la concentración de ferritina sérica elevada se debe principalmente a una sobrecarga de hierro y no al resultado del daño tisular o al aumento de la síntesis de ferritina. Una concentración de ferritina normal constituye una buena prueba contra la sobrecarga de hierro pero no excluye la hemocromatosis genética. Esto se debe a que la hemocromatosis es un trastorno de instauración tardía y los depósitos de hierro pueden mantenerse en intervalos normales durante muchos años.

Las concentraciones de ferritina sérica se elevan en pacientes con hemocromatosis avanzada, pero el cálculo de la ferritina sérica no debe utilizarse aisladamente en programas de detección en los familiares de los pacientes o para valorar de nuevo los depósitos de hierro tras la flebotomía. Las etapas iniciales de las acumulaciones de hierro son detectables debido al aumento en la concentración de hierro sérico, la reducción en la capacidad de fijación de hierro no saturado y el aumento en la saturación de la transferrina; la concentración de ferritina sérica puede encontrarse en el intervalo de la normalidad. En esta circunstancia, la medición del hierro sérico y de la capacidad total de fijación de hierro proporciona una información clínica muy valiosa que no obtenemos con el análisis de la ferritina.

En pacientes con enfermedad aguda o crónica, la interpretación de las concentraciones de ferritina sérica es menos directa[29] y los pacientes pueden tener concentraciones de ferritina sérica de hasta 100 µg/l a pesar de la ausencia de hierro teñible en la médula ósea. La síntesis de ferritina[30] está potenciada por la interleucina-1, que es el mediador primario de la respuesta en fase aguda. En pacientes con enfermedad crónica, se debe adoptar la siguiente estrategia: las concentraciones bajas de ferritina sérica indican la ausencia de depósitos de hierro, los valores en el rango normal indican niveles bajos o normales y los valores elevados

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

indican niveles normales o altos. En términos de idoneidad de los depósitos de hierro para reabastecer la hemoglobina en los pacientes con anemia, hay que considerar también el grado de la anemia. Así, un paciente con una Hb de 100 g/l puede beneficiarse de la terapia con hierro si la concentración de ferritina sérica es inferior a los 100 µg/l, porque por debajo de este valor es improbable que haya suficiente hierro disponible para una regeneración completa. En este caso puede ser de utilidad la medida de la concentración del receptor sérico de la transferrina (v. pág. 126).

Inmunológicamente, la ferritina del plasma se parece a las ferritinas «ricas en L» del hígado y del bazo y sólo se detectan concentraciones bajas con anticuerpos frente a la ferritina de las células cardíacas o de las células HeLa, que son ferritinas ricas en subunidades «H». La heterogeneidad de la ferritina sérica para su análisis por isoelectroenfoque se debe principalmente a la glucosilación y a la presencia de cantidades variables de residuos de ácido siálico y no a la variación en el cociente entre las subunidades H y L[31]. Los intentos de analizar las isoferritinas «acídicas» (o ricas en «H») en el suero como marcadores tumorales no han tenido éxito[32,33]. El contenido en hierro de la ferritina sérica es bajo[31] y su medición no tiene utilidad diagnóstica[34].

CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE HIERRO EN EL SUERO

El hierro es transportado en el plasma unido a la proteína transferrina (masa molecular, 78.000). Esta molécula une dos átomos de hierro en forma de Fe^{3+} y aporta hierro a las células por interacción con el receptor de transferrina en la membrana. El método siguiente es una modificación del recomendado por el International Council for Standardization in Haematology (ICSH) y se basa en el desarrollo de un complejo coloreado cuando el hierro ferroso se trata con una solución cromógena[35].

Reactivos y materiales

Todos los reactivos deben ser de grado analítico con el menor contenido posible en hierro.

Preparación del material de cristal

Es esencial evitar la contaminación por hierro. Si es posible, utilizar tubos y botellas de plástico desechables. Si se utilizan tubos de cristal, lavarlos con una solución detergente, sumergirlos en HCl 2 mol/l durante 12 h y aclararlos finalmente en agua libre de hierro.

Proteína precipitante

100 g/l de ácido tricloroacético (0,61 M) y 30 ml/l de ácido tioglicólico en 1 mol/l de HCl. Esta solución puede almacenarse en la oscuridad durante 2 meses. El ácido ascórbico es un agente reductor alternativo, aunque puede presentar más interferencias debido al cobre. Sin embargo, cualquier beneficio obtenido por la menor interferencia con el cobre queda contrarrestado por los problemas de higiene y seguridad generados al trabajar con ácido tioglicólico. En un tubo de 50 ml con tapón de rosca, añadir 5 ml de una solución de ácido tricloroacético 6,1 mol/l (Sigma 490–10) a 45 ml de HCl 1 mol/l. Añadir 200 mg de ácido ascórbico y mezclar. Hacer una solución nueva cada vez que se necesite y desecharla pasadas 4 h.

Solución cromógena

En 100 ml de acetato de sodio 1,5 mol/l disolver 25 mg de ferrozina [monosodio 3-(2-piridil)-5, 6-bis(4-ácido fenilsulfónico)-1, 2, 4-triazina]. Almacenar hasta un máximo de 4 semanas en la oscuridad.

Estándar de hierro, 80 µmol/l

Añadir 22,1 ml de agua desionizada a un contenedor universal (la forma más sencilla es mediante el peso). Añadir 200 µl de HCl 2 mol/l y mezclar. Añadir 100 µl de solución de hierro estándar (1.000 µg de Fe/ml en HCl al 1%, Aldrich n.º 30595–2) y mezclar. Almacenar hasta 2 meses a temperatura ambiente.

Agua sin hierro

Utilizar agua desionizada para la preparación de todas las soluciones.

Método

Colocar 0,5 ml de suero (sin rastros de hemólisis), 0,5 ml de la solución de trabajo de hierro estándar y 0,5 ml de agua sin hierro (como blanco), respectivamente, en cada uno de tres tubos Eppendorf de plástico de 1,5 ml con tapa. Añadir 0,5 ml de precipitante de proteína y volver a colocar la tapa. Mezclar vigorosamente el contenido (p. ej., con un mezclador de vórtice) y dejarlo reposar durante 5 min. Centrifugar el tubo que contiene el suero a 13.000 g durante 4 min (en una microcentrífuga) para obtener un sobrenadante ópticamente claro. Añadir a 0,5 ml de este sobrenadante y a 0,5 ml de cada una de las otras mezclas, 0,5 ml de la solución cromógena mezclándola exhaustivamente. Tras dejarlo reposar durante 10 min, medir la absorbancia en un espectrofotómetro contra agua a 562 nm. Si no se dispone de una microcentrífuga, utilizar el doble del volumen de suero y de los reactivos en un tubo de plástico de 3 ml con tapa y centrifugar a 1.500 g durante 15 min en una centrífuga de sobremesa.

Si se utiliza plasma con EDTA, el color aparece más lentamente y hay que dejar reposar la preparación durante al menos 15 min antes de medir la absorbancia. No se recomienda el uso de plasma con EDTA. Los quelantes del hierro (p. ej., la desferoxamina) también retrasan la aparición del color[36].

Cálculo

$$\text{Hierro sérico (µmol/l)} = \frac{(A_{562}\ \text{prueba} - A_{562}\ \text{blanco})}{(A_{562}\text{estándar} - A_{562}\text{blanco})} \times 80$$

PROCEDIMIENTO ALTERNATIVO: HIERRO SÉRICO SIN PRECIPITACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Éste es un método que utiliza la placa de microtitulación desarrollado a partir del análisis de Persijn y cols.[37]

Reactivos y materiales

Estándar de hierro

80 µmol/l (v. el apartado anterior). Diluir con un volumen igual de agua para hacer el estándar a 40 µmol/l.

Tampón fosfato-ascorbato (depósito)

Añadir aproximadamente 200 ml de agua desionizada a un vaso de precipitado de plástico lavado con ácido. Añadir 17,5 g de dihidrógeno ortofosfato de sodio ($NAH_2PO_22H_2O$) al agua y disolver completamente por agitación (agitador de plástico). Ajustar el pH a 4,9 utilizando una solución de NaOH 2 M (2 g de NaOH en 25 ml de agua). Preparar un volumen de 250 ml y depositar 25 ml del tampón en 10 contenedores universales. Almacenar hasta 1 mes a temperatura ambiente. Antes de utilizar, añadir 50 mg de ácido ascórbico a cada contenedor universal que se vaya a usar y agitarlo para disolverlo. Desechar tras 4 h.

Solución cromógena

Añadir 50 mg de ferrozina (v. pág. 122) a 25 ml de agua desionizada y agitar hasta disolverla. Almacenar hasta 1 mes en la oscuridad a temperatura ambiente.

Placas de microtitulación

Las placas de microtitulación deben ser de calidad óptica, con pocillos de fondo plano.

Suero de control

Resultan adecuados los sueros de control Lyphochek (Bio-rad).

Método

Añadir 80 µl de agua desionizada («0»), solución estándar (40, 80 µmol/l), controles (C1, C2) y muestras (S1, S2, etc.) a la placa de microtitulación (v. el plano de la placa, fig. 7.3).

Añadir 80 µl de tampón fosfato-ascorbato a cada pocillo, utilizando una pipeta multicanal. Tapar la placa para hacer la mezcla. Dejar durante 20 min. Durante este tiempo, realizar una lectura inicial de la absorbancia de la placa a 560-570 nm en un lector de placas de microtitulación. Añadir 40 µl de la solución cromógena a cada pocillo, y después agitar ligeramente para homogeneizar. Cubrir con una película o con una tapa. Incubar durante 40 min a 37 °C. Hacer una segunda lectura de la absorbancia. Calcular los valores de absorbancia netos.

Cálculos

Calcular la diferencia en la absorbancia (δA) entre las lecturas finales e iniciales para el agua usada como blanco (δA_0), para cada estándar (δA_{40}, δA_{80}) y para la muestra del suero ($\delta A_{muestra}$).

Los valores aproximados son 0,015-0,03 para el agua usada como blanco (estándar cero) y 0,25-0,28 para el estándar de 40 µmol Fe/l. Sustraer el valor neto medio del estándar cero (δA_0) de cada estándar o muestra ($\delta A_{muestra}$). El valor neto del estándar de 80 µmol/l debería ser 2× el del estándar de 40 µmol/l.

Las concentraciones de hierro en el suero son:

$$\frac{\Delta A_{muestra} - \Delta A_0 \times 40\ \mu mol/l}{\Delta A_{40} - \Delta A_0}$$

Los datos pueden obtenerse del lector de la placa e importarse a una base de datos adecuada o a un programa estadístico (p. ej., Excel o Minitab) para hacer estos cálculos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	80	C1	S1	S5	S9	S13	S17	S21	S25	S29	S33
B	0	80	C1	S1	S5	S9	S13	S17	S21	S25	S29	S33
C	0	80	C1	S2	S6	S10	S14	S18	S22	S26	S30	S34
D	0	80	C1	S2	S6	S10	S14	S18	S22	S26	S30	S34
E	40	0	C2	S3	S7	S11	S15	S19	S23	S27	S31	S35
F	40	0	C2	S3	S7	S11	S15	S19	S23	S27	S31	S35
G	40	0	C2	S4	S8	S12	S16	S20	S24	S28	S32	S36
H	40	0	C2	S4	S8	S12	S16	S20	S24	S28	S32	S36

Figura 7.3. Mapa de la placa para la determinación de hierro sérico.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Métodos automatizados

La mayoría de los analizadores de bioquímica clínica disponen de procedimientos para medir el hierro sérico. Randox Ltd (www.randox.com) dispone de un método no precipitante similar al descrito anteriormente. Tietz y cols.[38] revisaron las prestaciones de diversos métodos y encontraron diferencias entre ellos, sobre todo a concentraciones bajas de hierro sérico. Recientemente, Blanck y cols.[39] realizaron una comparación interlaboratorios y no encontraron diferencias significativas en los resultados generados por los métodos actualmente en uso. La variabilidad entre los laboratorios y entre los métodos fue baja. Las concentraciones de hierro sérico pueden medirse por espectroscopia de absorción atómica, que tiene sin embargo la desventaja de medir cualquier hierro hemo que se encuentre presente como resultado de una hemólisis.

CONCENTRACIONES DE HIERRO SÉRICO EN ESTADO NORMAL Y EN LA ENFERMEDAD[36]

Jacobs y cols.[40] midieron las concentraciones de hierro sérico en una muestra aleatoria de 517 mujeres y 499 hombres de la población general de Gales. Las concentraciones de hierro en el suero se aproximaron a una distribución normal. La media (± DE) en las mujeres (16,1 ± 7,4 µmol/l) fue ligeramente inferior a la de los hombres (18,0 ± 6,3 µmol/l). Estas cifras no se refieren a los sujetos «repletos de hierro», porque también se incluyeron los sujetos sin depósitos de hierro o con una anemia manifiesta. Utilizando el método de la placa de microtitulación descrito anteriormente, Jackson y cols.[41] determinaron las concentraciones de hierro sérico en 10.500 donantes de sangre del sur de Gales. En 1.502 donantes «de primera donación», con una edad media de 28 años, la media (± DE) fue de 16,7 ± 6,0 µmol/l para los hombres y 14,4 ± 6,7 µmol/l para las mujeres. Nuevamente, entre los sujetos se incluía a los donantes potenciales que no superaron la prueba de detección de anemia y a los que no se permitió donar sangre en esta ocasión. En el primer mes de vida la concentración media de hierro sérico es más alta (22 µmol/l) que la de los adultos; se reduce a cerca de 12 µmol/l a la edad de 1 año y se mantiene en ese valor durante la infancia[42,43].

La medición de la concentración de hierro sérico aislada proporciona una información clínica de poca utilidad, porque, aunque la variación metodológica sea baja, ésta es, sin embargo, considerable de hora en hora y de día a día en los individuos normales (v. pág. 130). Se encuentran concentraciones bajas en pacientes con anemia ferropénica, con enfermedades crónicas (incluyendo la inflamación, la infección y el cáncer) y durante la fase de respuesta aguda, incluida la poscirugía. Por tanto, las concentraciones bajas de hierro sérico no indican necesariamente una ausencia de depósitos de hierro. Concentraciones elevadas se encuentran en hepatopatías, anemias hipoplásicas, eritropoyesis ineficaz y en la sobrecarga de hierro.

CAPACIDAD DE FIJACIÓN DE HIERRO, TRANSFERRINA SÉRICA Y SATURACIÓN DE LA TRANSFERRINA

Cálculo de la capacidad total de fijación de hierro

En el plasma, el hierro está unido a la transferrina y la capacidad total de fijación del hierro (TIBC, del inglés *total iron-binding capacity*) es una medición de esta proteína. La capacidad de fijación de hierro adicional de la transferrina se conoce como la capacidad no saturada de fijación del hierro (UIBC, del inglés *unsaturated iron-binding capacity*). La concentración de hierro sérico junto con la UIBC da la TIBC.

La capacidad de fijación de hierro se determina habitualmente añadiendo un excedente de hierro y midiendo el hierro que se retiene en la solución tras añadir un reactivo adecuado, como el carbonato de magnesio ligero o una resina de intercambio iónico que elimine el exceso de hierro. Todos los métodos son empíricos y ninguno es completamente satisfactorio. El método descrito a continuación fue desarrollado por el ICSH[44].

Principio

Se añade al suero un excedente de hierro en forma de cloruro férrico. Todo el hierro que no se fije a la transferrina se elimina con un excedente de carbonato de magnesio. A continuación se mide la concentración del hierro en el suero saturado de hierro.

Reactivos

Carbonato de magnesio básico, $MgCO_3$, «grado ligero». Solución saturante (100 µmol Fe/l). Añadir 17,7 ml de agua desionizada a un recipiente universal (la forma más sencilla es mediante el peso). Añadir 100 µl de HCl 1 mol/l. Añadir 100 µl de una solución de hierro estándar (v. pág. 122). Mezclar y almacenar hasta 2 meses a temperatura ambiente. La «solución saturante de hierro» contiene 5,6 µg de Fe/ml (100 µmol Fe/l).

Método

Colocar 0,5 ml de suero (no se debe utilizar plasma con EDTA) en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y añadir 0,5 ml de solución saturante de hierro. Mezclar cuidadosamente a mano y dejarlo a temperatura ambiente durante 15 min. Utilizar una cuchara de plástico o un tubo para añadir 100 mg (±15 mg) de carbonato de magnesio ligero y tapar el tubo Eppendorf. Agitar enérgicamente y dejarlo en posición vertical durante 30 min, mezclándolo ocasionalmente. Centrifugar a 13.000 g durante 4 min en una microcentrífuga. Si el sobrenadante contiene trazas de carbonato de magnesio, eliminar el sobrenadante y volver a centrifugar. Extraer cuidadosamente 0,5 ml de sobrenadante y tratarlo como si fuera el suero para el cálculo de hierro descrito anteriormente. Multiplicar por 2 el resultado final.

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE FIJACIÓN INSATURADA DEL HIERRO

La UIBC puede determinarse por métodos que detectan el hierro restante, capaz de unirse al cromógeno, tras añadir una cantidad de estándar y un excedente de hierro al suero[37]. La UIBC es la diferencia entre la cantidad añadida y la cantidad fijada al cromógeno.

Reactivos y materiales

Solución saturante 2.000 µmol/l

Depositar 7,95 ml de agua desionizada en un recipiente universal (la forma más adecuada es mediante el peso). Añadir 1,0 ml de solución de hierro estándar (v. pág. 122, HCl). Mezclar. Almacenar hasta 2 meses a temperatura ambiente.

Tampón Tris (solución de almacenamiento)

Depositar aproximadamente 200 ml de agua desionizada en un vaso de precipitados pesado y lavado con ácido. Añadir 6,8 g de Tris al agua y disolver completamente agitando con un agitador de plástico. Ajustar el pH a 7,8 utilizando HCl 2 M. Rellenar con agua hasta alcanzar un volumen de 250 ml (mediante el peso), mezclar y verter 24,5 ml (24,5 g) en recipientes universales. Almacenar hasta 1 mes a temperatura ambiente.

Tampón Tris-ascorbato-hierro

Inmediatamente antes de su uso, añadir 50 mg de ácido ascórbico a cada recipiente universal del tampón Tris que se vaya a usar y agitarlo para disolverlo. Añadir 0,5 ml de la solución saturante (2.000 µmol/l) y mezclar. Desechar tras 4 h.

Solución cromógena

Véase la página 122.

Bandejas de microtitulación

Véase la página 123.

Suero de control

Véase la página 123.

Método

Depositar 80 µl de agua desionizada («0»), control (C1, C2) y muestras (S1, S2, etc.) en la placa de microtitulación (fig. 7.4). Añadir 160 µl de tampón Tris-ascorbato-hierro a cada pocillo, utilizando una pipeta multicanal. Tapar la bandeja para hacer la mezcla. Dejar durante 20 min. Durante este tiempo, realizar una lectura inicial ($A_{inicial}$) de la $A_{560-570\ nm}$. Añadir 40 µl de la solución cromógena a cada pocillo, y después tapar la bandeja para hacer la mezcla. Cubrir con una película o con una tapa. Incubar durante 40 min a 37 °C. Hacer una lectura final de la absorbancia (A_{final}).

Cálculos

La solución saturante añadida a cada pocillo (160 µl) contiene 6,4 nmol de Fe. Calcular la lectura de la absorbancia correspondiente a los 6,4 nmol de Fe a partir del valor medio de las lecturas en la columna 1 como $A_{final} - A_{inicial}$ (A_s). (Nota: esta lectura de la absorbancia debe estar comprendida dentro del 5% del valor de los 80 µmol/l para la determinación de hierro.)

Una vez calculada la A_s, se utiliza en la siguiente ecuación:

Para los controles 1 y 2 y las muestras:

$$UIBC = [1 - (A_{final} - A_{inicial})] / A_s \times 80\ \mu mol/l$$

Los datos pueden importarse a una base de datos para su cálculo. Igual que con la determinación de hierro sérico, a veces los protocolos de los analizadores de bioquímica clínica incluyen un método para determinar la UIBC.

Determinación de la capacidad total de fijación de hierro a partir de la UIBC:

$$TIBC = \text{hierro sérico} + UIBC\ (\mu mol/l)$$

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	C1	S1	*S5*	*S9*	*S13*	*S17*	*S21*	*S25*	*S29*	*S33*	*S37*
B	0	C1	S1	*S5*	*S9*	*S13*	*S17*	*S21*	*S25*	*S29*	*S33*	*S37*
C	0	C1	S2	*S6*	*S10*	*S14*	*S18*	*S22*	*S26*	*S30*	*S34*	*S38*
D	0	C1	S2	*S6*	*S10*	*S14*	*S18*	*S22*	*S26*	*S30*	*S34*	*S38*
E	0	C2	S3	*S7*	*S11*	*S15*	*S19*	*S23*	*S27*	*S31*	*S35*	*S39*
F	0	C2	S3	*S7*	*S11*	*S15*	*S19*	*S23*	*S27*	*S31*	*S35*	*S39*
G	0	C2	S4	*S8*	*S12*	*S16*	*S20*	*S24*	*S28*	*S32*	*S36*	*S40*
H	0	C2	S4	*S8*	*S12*	*S16*	*S20*	*S24*	*S28*	*S32*	*S36*	*S40*

Figura 7.4. Mapa de la placa para la determinación de la UIBC.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Métodos completamente automatizados

Al utilizar los analizadores de bioquímica clínica para determinar la TIBC, encontramos que hay diversos métodos que requieren un paso previo al tratamiento. Se han desarrollado métodos directos (procedimientos completamente automatizados)[45]. Randox Ltd (www.randox.com) dispone de un método no precipitante similar al descrito anteriormente.

TRANSFERRINA SÉRICA

Un enfoque alternativo es medir la transferrina directamente mediante un análisis inmunológico. Así se evitan algunos de los valores falsamente elevados de la TIBC encontrados cuando la transferrina está saturada y se mide el hierro no unido a la transferrina[35]. Los métodos de valoración por inmunonefelometría son rápidos y precisos[46]. En general, hay una buena correlación entre la TIBC química y la inmunológica[47,48], aunque cuando se calcula la TIBC como Fe sérico + UIBC, los valores son inferiores a los de la TIBC directa[47,48]. Las concentraciones de transferrina (g/l) pueden convertirse en TIBC (µmol/l) multiplicándolas por 25 y este factor parece ser adecuado tanto en la práctica como en la teoría[49].

Rango normal de la transferrina y capacidad total de fijación del hierro

En estado normal, la concentración de transferrina sérica oscila entre 2,0 y 3,0 g/l, y 1 mg de transferrina fija 1,4 µg de hierro. La TIBC del suero normal (media ± DE) fue de 68,0 ± 12,6 µmol/l en una muestra aleatoria de 517 mujeres y de 63,2 ± 9,1 µmol/l en 499 hombres[40]. En 890 mujeres que donaron sangre por primera vez, con una edad media de 27 años, la TIBC media (determinada por el método de la UIBC descrito antes) fue de 56,7 ± 12,1 µmol/l. En 612 hombres en su primera donación de sangre, con una edad media de 28 años, la media fue 54,2 ± 10 µmol/l (media ± DE)[41]. En ambos estudios, la muestra incluía individuos con déficit de hierro. Recordar el comentario anterior sobre los valores más bajos dados por el método colorimétrico para la UIBC. La TIBC está aumentada en la anemia ferropénica y en el embarazo; es inferior a lo normal en las infecciones, las enfermedades malignas y las nefropatías. En la sobrecarga patológica de hierro, la TIBC del suero está reducida.

Con fines diagnósticos, aunque una TIBC elevada es característica de la anemia ferropénica, habitualmente la TIBC se utiliza para calcular la saturación de la transferrina. La UIBC tiene poca utilidad diagnóstica, pero se está evaluando como prueba para la detección de la sobrecarga de hierro en la hemocromatosis genética. En la hemocromatosis genética (sujetos homocigotos para el *HFE* C282Y), se encontró una UIBC (determinada como se ha descrito anteriormente) inferior a 20 µmol Fe/l en la mayoría de los hombres y en cerca del 50% de las mujeres[41]. La UIBC y la saturación de la transferrina tuvieron la misma sensibilidad y especificidad. En los métodos para determinar la UIBC, se han modificado los umbrales óptimos para detectar a los sujetos con hemocromatosis. Murtagh y cols.[50] encontraron el umbral óptimo en los 25,6 µmol/l (sensibilidad 0,91 y especificidad 0,95). En este caso, se tomaron muestras sanguíneas en ayunas. En ambas publicaciones la UIBC resultó tan fiable como la saturación de la transferrina para detectar hemocromatosis hereditaria.

SATURACIÓN DE LA TRANSFERRINA

La saturación de la transferrina es la proporción entre la concentración de hierro sérico y la TIBC expresada como porcentaje. Si se mide la transferrina de forma inmunológica, la TIBC correspondiente (µmol/l) puede calcularse multiplicando la concentración de transferrina (g/l) por 25. En una muestra de la población galesa[40], la saturación media de la transferrina en 499 hombres fue de 29,1 ± 11,0% y en 517 mujeres fue de 24,6 ± 11,8%. En los que donaron sangre por primera vez del sur de Gales, la saturación media de la transferrina fue de 31,1 ± 10,9% en 612 hombres y de 25,5 ± 12,9% en 890 mujeres. Una saturación de la transferrina inferior al 16% se considera habitualmente indicativa de un suministro inadecuado de hierro para la eritropoyesis[51]. La mayor utilidad del cálculo de la saturación de la transferrina consiste en la detección de la hemocromatosis genética. Incluso en las etapas iniciales del desarrollo de la sobrecarga de hierro[41,52], la saturación de la transferrina elevada es indicativa del trastorno (los umbrales propuestos varían; sin embargo, los valores >55% en hombres y >50% en mujeres constituyen un acuerdo aceptable)[16].

Índice de la transferrina

Beilby y cols.[46] han propuesto que la saturación de la transferrina sea sustituida por el «índice de la transferrina». Representa la concentración de hierro sérico (µmol/l) dividida por la concentración de transferrina (determinada inmunológicamente y expresada en µmol/l). Alegan que el índice de la transferrina es más preciso que la saturación de la transferrina y tiene una mayor especificidad para detectar la sobrecarga de hierro que la saturación de la transferrina. Sin embargo, el índice de la transferrina se utiliza raramente.

RECEPTOR DE LA TRANSFERRINA SÉRICA

Casi todas las células en el organismo obtienen hierro a partir de la proteína plasmática, transferrina, pero la transferrina tiene una afinidad muy alta por el hierro a un pH neutro y la liberación del hierro se produce a través de un receptor de membrana específico. El receptor de la transferrina consiste en dos subunidades proteicas idénticas con una masa molecular de 95 kDa. La transferrina se une al

receptor, el complejo se internaliza y el hierro se libera cuando el pH de las vesículas internas se reduce a cerca del 5,5. Tras la liberación del hierro, la apotransferrina regresa a la circulación y puede utilizarse en ciclos posteriores de captación y suministro de hierro[53]. Las células que requieren la mayor parte del hierro son los hematíes nucleados en la médula ósea, que sintetizan la hemoglobina y presentan el mayor número de receptores para la transferrina. La síntesis del receptor de la transferrina está controlada también por el suministro de hierro. El mecanismo implica a los IRE (v. pág. 115), los elementos reguladores del hierro en la región 3' no traducida del ARNm del receptor. En ausencia de hierro, una IRP se une al ARN estabilizándolo y permitiendo la síntesis del péptido. En presencia de concentraciones adecuadas de hierro, la fijación del hierro por la IRP cambia la conformación de la proteína e impide su fijación al ARNm. El ARNm se degrada rápidamente y la síntesis de los receptores de la transferrina se reduce. El TFR2, un segundo receptor, también se une a la transferrina, pero su síntesis no está regulada por las IRP[54].

En 1986, Kohgo y cols.[55] notificaron que los receptores de la transferrina se podían detectar en el plasma por inmunoanálisis. Desde entonces, se ha investigado mucho sobre la importancia fisiológica y diagnóstica de los receptores circulantes de la transferrina[56]. La proteína se obtiene por proteólisis en la membrana celular y circula unida a la transferrina. Las concentraciones plasmáticas reflejan la cantidad de receptores celulares y, en los pacientes con depósitos adecuados de hierro, el número de hematíes nucleados en la médula ósea. Ya que el número de receptores celulares de la transferrina por célula aumenta en el déficit de hierro, sus concentraciones también aumentan cuando la eritropoyesis está limitada por el hierro. La tabla 7.4 resume los trastornos relacionados con valores reducidos o elevados del receptor circulante de la transferrina.

Tabla 7.4. Concentraciones del receptor sérico de la transferrina (RsTf) en los procesos patológicos del ser humano

Concentración del RsTf	Trastorno
Aumentada	Proliferación eritroide aumentada: Anemia hemolítica autoinmune Esferocitosis hereditaria β Talasemia intermedia o mayor β Talasemia/HbE Enfermedad de la hemoglobina H Anemia de células falciformes Policitemia vera Reducción de los depósitos tisulares de hierro: Anemia ferropénica
Normal a aumentada	Mielofibrosis idiopática Síndromes mielodisplásicos Leucemia linfocítica crónica
Normal	Hemocromatosis (no obstante, v. el texto) Leucemia mieloide aguda y crónica La mayoría de las neoplasias malignas linfoides Tumores sólidos Anemia por enfermedad crónica
Reducida	Insuficiencia renal crónica Anemia aplásica Postrasplante de médula ósea

Adaptado de Feelders y cols.[53].

Análisis del receptor de la transferrina sérica

No habido un acuerdo sobre la fuente del receptor de la transferrina como estándar o como antígeno para la generación de anticuerpos. Los receptores para la transferrina se han depurado a partir de la placenta y del suero. El receptor puede, o no, estar unido a la transferrina como un estándar o para la generación de anticuerpos. Por tanto no hay descrito un método de «referencia». La Medical Devices Agency ha evaluado tres equipos de inmunoanálisis enzimático (Orion; Ramco; R&D) para determinar las concentraciones séricas del receptor de la transferrina[57]. Todos ellos han sido aprobados con fines diagnósticos en los Estados Unidos por la Food and Drug Administration. Actualmente se están introduciendo sistemas de inmunoanálisis para realizar análisis diagnósticos, completamente automatizados, que ofrecen una sensibilidad, una reproducibilidad y una velocidad mejoradas. Un ejemplo es el sistema de Nichols Advantage (www.nicholsdiag.com).

Los distintos intervalos de referencia en los análisis comerciales disponibles reflejan las diferencias en las preparaciones del receptor de la transferrina utilizadas para la creación de anticuerpos y como estándar en los diversos análisis. En los equipos Orion, Ramco y R&D, Akesson y cols.[58] y Worwood y cols.[57] observaron algunas desviaciones en el análisis pero encontraron aceptables los valores del coeficiente de variancia (CV) intraanálisis. La sensibilidad determinada era adecuada para fines clínicos en los tres sistemas de análisis. Existen diferencias en las unidades y en las cantidades absolutas para las concentraciones de los receptores séricos de la transferrina. Se utilizan cuatro unidades diferentes (nmol/l, g/ml, mg/l [ng/ml], y kU/l) y distintos intervalos de normalidad[59]. En el momento actual el receptor sérico de la transferrina (RsTf) no está incluido en los Esquemas nacionales para el control de calidad externo en el Reino Unido (NEQAS, del inglés *National External Quality Control Schemes*) ni en el Esquema para la valoración de la calidad externa en Gales (WEQAS, del inglés *Welsh External Quality Assessment Scheme*).

Intervalos de referencia

Las concentraciones del RsTf son altas en los neonatos y disminuyen hasta alcanzar las concentraciones de los adultos a la edad de 17 años. Las concentraciones son similares en los hombres y en las mujeres normales, a diferencia de las concentraciones en el suero, que son menores en las

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

mujeres premenopáusicas que en los hombres. Durante el embarazo los valores de RsTf aumentan, regresando a los valores pregestacionales a las 12 semanas del parto[60]. Las concentraciones del RsTf en los diferentes sistemas de análisis no pueden compararse directamente porque los intervalos de referencia varían. En el momento actual, es necesario establecer un intervalo de referencia a partir de un panel de sujetos sanos o aceptar el recomendado por el fabricante.

Muestras

La información suministrada por los fabricantes muestra una buena recuperación del estándar y de la linealidad y algunos problemas con la interferencia. Aunque el suero es la matriz preferida, los análisis R&D y Ramco dan los mismos resultados en plasma con EDTA, heparina y citrato. Orion dice que el plasma-EDTA no es aceptable. Se recomienda que los sueros se almacenen durante no más de 2 días a temperatura ambiente, 7 días a 2-8 °C, 6 meses a –20 °C y 1 año a –70 °C. La congelación y descongelación repetidas no son aconsejables. La hemólisis moderada no es un problema. No hay interferencia con concentraciones de bilirrubina sérica inferiores a los 1.700 µmol/l (R&D) o a los 280 µmol/l (Orion). Sin embargo, Ramco observó que la adición de bilirrubina a una concentración de 17 µmol/l (10 µg/ml) originaba un aumento del 16% en la concentración aparente del receptor sérico de la transferrina. Esto representa una concentración de bilirrubina de aproximadamente sólo dos veces el límite superior de la normalidad.

Concentraciones del receptor de la transferrina para el diagnóstico

Eritropoyesis

La función del RTf de suministrar hierro al eritrocito inmaduro sugirió inmediatamente una aplicación en el laboratorio clínico para el análisis del RTf circulante. Diversos autores han explorado la utilización del análisis para controlar los cambios en la tasa de la eritropoyesis[61-63]. Cuando no hay limitación del aporte férrico, el análisis puede ser un sustituto de las investigaciones ferrocinéticas que requieren la inyección de hierro radiactivo[64].

Déficit de hierro

La principal aplicación del receptor sérico de la transferrina ha sido la detección de pacientes con ausencia de depósitos de hierro (ferritina y hemosiderina en las células). Cuando se somete a los sujetos normales a una flebotomía cuantitativa, las concentraciones de ferritina sérica se reducen continuamente a medida que se deplecionan los depósitos de hierro, aunque se producen pocos cambios en la concentración del RsTf. Con el agotamiento de los depósitos de hierro (ferritina sérica <15 µg/l), los valores del RsTf aumentan y continúan aumentando mientras que las concentraciones de hemoglobina disminuyen[65]. En este estudio el aumento de la tasa de eritropoyesis durante la flebotomía tuvo poco efecto en los valores del RsTf siempre y cuando los depósitos de hierro fueran adecuados, por lo que la mayor parte del aumento en el valor del RsTf debe ser el resultado del déficit de hierro más que del aumento de la eritropoyesis. Sin embargo, las flebotomías representaron sólo 250 ml por semana (actualmente se eliminan cerca de 500 ml por semana durante el tratamiento de la hemocromatosis) y cantidades superiores podrían producir un aumento inmediato de los valores del RsTf durante la flebotomía. El log[RsTf/ferritina sérica] establece una relación lineal con el depósito de hierro que tiene un considerable potencial para valorar los depósitos de hierro en los estudios epidemiológicos[66]. En los lactantes (con edades entre los 8 y los 15 meses) la concentración del RsTf aumenta a medida que aumenta la gravedad del déficit de hierro[67].

Los valores del receptor circulante de la transferrina aumentaron, no solamente en los pacientes con déficit simple de hierro, sino también en los pacientes con anemia por enfermedad crónica, sin hierro teñible en la médula ósea[68]. La detección de la falta de depósitos de hierro es difícil en pacientes con anemia por enfermedad crónica, porque las concentraciones de hierro sérico son bajas, independientemente de los depósitos de hierro, y las concentraciones de ferritina sérica, aunque reflejen el valor de los depósitos de hierro, son mayores que las de los pacientes que no padecen una enfermedad crónica (v. pág. 121). Sin embargo, en diversos estudios, el RsTf no ha demostrado ser mejor que la ferritina sérica para detectar el déficit de hierro[119-125].

Tanto en la anemia ferropénica como en la anemia por enfermedad crónica, los valores del RsTf están también influidos por los cambios en la tasa de la eritropoyesis. La eritropoyesis ineficaz (aumento en la proporción de los hematíes inmaduros destruidos en el interior de la médula ósea) se incrementa en la anemia ferropénica[69]. En la anemia por enfermedad crónica, la eritropoyesis está normal o reducida[69]; sin embargo, el déficit de hierro aumenta el número de los receptores[70].

Aunque se ha afirmado que las mediciones del RsTf constituyen un indicador sensible del déficit de hierro en el embarazo[71], aún persisten algunos interrogantes sobre la reducción de la eritropoyesis al principio del mismo, porque la gestación puede enmascarar el déficit de hierro en esta etapa[72] y los aumentos del RsTf al final del embarazo parecen relacionarse con un aumento de la eritropoyesis más que con una depleción del hierro[60]. Las mediciones del RsTf no incrementan la sensibilidad ni la especificidad para la detección de la anemia ferropénica en las embarazadas de Malawi, donde la anemia y la enfermedad crónica son muy prevalentes[73].

Sobrecarga de hierro

Se han notificado concentraciones normales del RsTf en pacientes con hemocromatosis genética (aunque algunos habían sido flebotomizados) y también en pacientes con sobrecarga de hierro africana[74]. En cambio, se encontraron valores medios inferiores del RsTf en sujetos con una saturación de la transferrina elevada[75,76]. Sin embargo, la superposición con el intervalo normal de la concentra-

ción del RsTf es considerable y no es probable que la medición del RsTf tenga un valor diagnóstico en la sobrecarga de hierro.

PROTOPORFIRINA ERITROCITARIA

El análisis de la protoporfirina eritrocitaria (PE)[13] se ha realizado durante muchos años como prueba para la detección de la intoxicación por plomo. Recientemente, se ha generado un considerable interés en su utilización para evaluar el aporte de hierro a la médula ósea. La concentración de protoporfirina «libre» de los hematíes aumenta en el déficit de hierro. Habitualmente, más del 95% está presente como protoporfirina de cinc (PPC). El método original requiere una extracción química y la utilización de un espectrómetro de fluorescencia. Hoy en día, para la detección del déficit de hierro, este método se ha sustituido ampliamente por la medición directa de la fluorescencia de la PPC (µmol/mol hemo) con un instrumento denominado hematofluorímetro.

Analizadores

Existen dos analizadores específicos: el Proto Fluor Z de Helena Laboratories, Beaumont, Texas (www.helena.com) y el analizador portátil de Aviv Biomedical, Inc. (www.avivbiomedical.com). Hay que utilizar los analizadores de la forma exacta que describe el fabricante. Las ventajas consisten en el pequeño tamaño de la muestra (alrededor de 20 µl de sangre venosa o por punción cutánea), la simplicidad, la rapidez y la reproducibilidad en un laboratorio. Además, la prueba tiene una interesante aplicación retrospectiva. Dado que se tarda semanas en reemplazar una proporción significativa de los hematíes circulantes con las nuevas células, es posible hacer un diagnóstico de anemia ferropénica algún tiempo después de que la terapia con hierro haya comenzado. Las enfermedades crónicas que reducen la concentración de hierro sérico, pero no los depósitos de éste, aumentan también los valores de la protoporfirina[77].

Aplicaciones diagnósticas

La medición de los valores de PE como indicador del déficit de hierro ofrece ventajas particulares en hematología pediátrica y en las investigaciones a gran escala, en las que el pequeño tamaño de la muestra y la simplicidad de la prueba son importantes. El intervalo normal en los adultos es menor de 70 µmol/mol hemo. Los valores medios en las mujeres normales son ligeramente superiores que en los hombres[78]. Un factor de confusión potencial es la contribución de otros compuestos fluorescentes (fármacos incluidos) del plasma, y las concentraciones son inferiores si lo que se analiza son los hematíes lavados[79]. Garrett y Worwood[80] encontraron una media (intervalo) de 44 (30-68) µmol/mol hemo en mujeres y de 41 (29-64) en hombres. Sin embargo, el lavado es un proceso tedioso que se realiza raramente. Los rangos de referencia pediátricos se han determinado en 6.478 sujetos (con edades entre 0 y 17 años)[81]. Los valores medios de la PPC fueron superiores en las mujeres que en los hombres y se redujeron ligeramente con la edad. Se observó una variación diurna, siendo las concentraciones de PPC más elevadas entre las 18.00 horas y la medianoche. No se dio ninguna explicación para este hecho.

La OMS[28] ha recomendado determinados valores para la detección del déficit de hierro. En niños menores de 5 años de edad, los valores deben ser superiores a 61 µmol/mol hemo; para los demás sujetos, los valores deben ser superiores a 70 µmol/mol hemo. Estos valores superan los del percentil del 97,5 establecidos a partir de investigaciones en niños sanos[81] y se basan en la sensibilidad y la especificidad para detectar la ausencia de depósitos de hierro.

Unidades

Para hacer la conversión entre las diversas unidades utilizadas para expresar los valores de protoporfirina, se pueden aplicar los siguientes cálculos:

µg PE/dl eritrocito = µg PE/dl sangre completa/hematocrito.
De µg PE/dl eritrocito a µg PE/g Hb, multiplicar por 0,037.
De µg PE/dl eritrocito a µmol PE/mol hemo, multiplicar por 0,87.

Estos factores se basan en una concentración de hemoglobina corpuscular media asumida como normal, aunque ésta pueda medirse en muestras individuales y pueda calcularse un factor apropiado.

La infección y la inflamación, la intoxicación por plomo y la anemia hemolítica causan una elevación significativa de la PPC. La medición de la PPC es más útil cuando el déficit de hierro es habitual y los otros trastornos son infrecuentes. Por tanto, en el laboratorio clínico general, la PPC proporciona menos información sobre los valores del depósito de hierro en pacientes con anemia que los análisis de la ferritina sérica[82].

Aunque las muestras de sangre pueden tomarse en cualquier momento del día, se requiere sangre fresca (las muestras no deben estar congeladas) y el método no ha sido automatizado.

VARIABILIDAD METODOLÓGICA Y BIOLÓGICA DE LOS ANÁLISIS

Los análisis sanguíneos varían enormemente tanto en la estabilidad metodológica como en la biológica. Las concentraciones de hemoglobina son estables y la utilización de un método simple y bien estandarizado garantiza que las variaciones diarias entre los individuos sean relativamente pequeñas (tabla 7.5). Los contadores automatizados de células analizan al menos 10.000 células y de esta forma se incrementa la precisión. Los valores de PPC parecen ser también relativamente estables. Cuanto más complicados sean los procedimientos implicados en los inmuno-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 7.5. Variabilidad global de los análisis del estado del hierro (intrasujeto, coeficiente de variancia diaria en sujetos sanos)

Hb	Ferritina sérica	Hierro sérico	TIBC	PPC	RsTf	Bibliografía
	15 (H; M)					83
1,6 (M)	15 (H; M)					112
		29(M)				113
		27 (H)				114
3 (HM)						115
	15 (H; M)	29 (H; M)				116
	13 (H; M)[a]	33 (H; M)[a]	11 (H; M)[a]			117
4 (HM)	14 (H) 26 (M)	27 (H) 28 (M)				84
	27 (H; M)	29 (H; M)	7 (H; M)		14 (H; M)	94
	26 (M)[V] 15 (H)[V] 28 (M)[C] 12 (H)[C]				14 (M) 12 (H) 11(M) 10 (H)	86
				5 (H; M)		79
3 (M)[b]	11 (M)[b]	26 (M)[b]	4 (M)[b]		13 (M)[b]	118

H, hombre; M, mujer; RsTf, receptor sérico de la transferrina; TIBC, capacidad total de fijación de hierro; PPC, protoporfirina de cinc; [C] sangre capilar; [V] sangre venosa.
[a] Pacientes con anemia.
[b] Mujeres sanas de 70 a 79 años de edad.

análisis, mayores serán las variaciones metodológicas en los análisis de la ferritina sérica (CV de al menos el 5%) y esto, junto con alguna variación fisiológica, da un CV global para la ferritina sérica de un individuo, en un período de algunas semanas, del orden del 15%. No obstante, hay poca evidencia de variación diurna significativa en la concentración de la ferritina sérica[83]. La determinación del hierro sérico es un ejemplo extremo de la unión de una variación metodológica razonablemente baja con una variabilidad fisiológica máxima, dando un CV global «intraindividuo» de aproximadamente un 30%, cuando las muestras venosas se toman en el mismo momento del día. Se ha notificado un ritmo diurno con valores más elevados por la mañana que al final de la tarde, cuando la concentración puede descender al 50% del valor matinal[36]. Sin embargo, las variaciones no son consistentemente diurnas[83a]. La fluctuación circadiana es en gran medida el resultado de la variación en la liberación de hierro por el sistema reticuloendotelial al plasma. Hay que indicar que en los estudios resumidos en la tabla 7.5, el tipo de muestra sanguínea, la duración del período de estudio y los análisis estadísticos varían. La variabilidad un tanto mayor de la Hb y de la ferritina notificada por Borel y cols.[84] pueden ser el resultado de haber utilizado sangre capilar y plasma. Pootrakul y cols.[85] han demostrado que la concentración de ferritina plasmática media es ligeramente superior en los especímenes capilares que en los venosos y que la variación inter e intramuestras era aproximadamente tres veces mayor. La variabilidad fue menor para el suero capilar que para el plasma, pero, aún así, superior que para el suero venoso. Sin embargo, la mayor variabilidad de las muestras capilares puede estar relacionada con la técnica de muestreo, porque Cooper y Zlotkin[86] encontraron pocas diferencias en la variabilidad entre las muestras venosas y las capilares.

El efecto de la menstruación en los indicadores del estado de hierro se examinó en 1.712 mujeres con edades entre los 18 y los 44 años en el Second National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES II) tras ajustarlo para los factores de confusión potenciales. Los valores medios ajustados de la Hb, la saturación de la transferrina y la ferritina sérica fueron inferiores en las mujeres cuya sangre se extrajo durante la menstruación y superiores en las mujeres examinadas en la fase luteínica o luteínica tardía del ciclo menstrual (Hb, 130 frente a 133 g/l; saturación de la transferrina, 21,2% frente a 24,8%, $P < 0,01$ para ambas; ferritina sérica, 17,2 frente a 24,0 µg/l, $P < 0,05$). La estimación de la prevalencia de alteraciones en los prámetros del estado del hierro fue significativamente mayor en las mujeres cuya sangre se extrajo durante la fase menstrual que en las mujeres cuya sangre se extrajo durante la fase luteínica y luteínica tardía. Los autores concluyeron que las variaciones cíclicas en los indicadores del estado de hierro son una fuente potencial de error cuando el estado del hierro se valora en estudios poblacionales amplios, que incluyen mujeres en edad reproductora[87].

El hambre o incluso el ayuno durante un corto período de tiempo pueden producir aumentos de la concentración de ferritina sérica[88] y el déficit de vitamina C puede en cambio reducir su concentración[89]. El ejercicio moderado tiene poco efecto sobre la concentración de ferritina sérica[90], aunque el ejercicio extenuante produce aumentos en la misma como resultado del daño muscular y de las reacciones inflamatorias[91,92]. Se han notificado cambios estacionales en los parámetros eritrocitarios[93], y Maes y cols.[94] encontraron patrones estacionales estadísticamente significativos para el hierro sérico, la transferrina, la ferritina sérica y el RsTf. La diferencia entre los puntos más alto y más bajo en la variación anual, expresada como porcentaje de la media, fue mayor para la ferritina sérica (39%) y más pequeña para el RsTf y la transferrina (12%).

Estos resultados tienen implicaciones claras en el uso de estos análisis en los estudios poblacionales[95-97]. Para el diagnóstico exacto se requiere un análisis multiparamétrico o el análisis de diversas muestras. Para la hemoglobina, una muestra basta para tener un intervalo de confianza del 95% y una exactitud del 20%[98]; para el RsTf se necesitó también una sola muestra[86,99]; sin embargo, para la ferritina se necesitaron de una a tres muestras[86,98]. Éste es el número de días requerido para estimar el valor medio real del indicador para un sujeto (es decir, dentro del 20% del valor verdadero, 95% del tiempo).

VALOR PREDICTIVO DE LOS INDICADORES DEL METABOLISMO DEL HIERRO

El principal uso diagnóstico de las diversas mediciones del metabolismo del hierro es el diagnóstico diferencial de la anemia hipocrómica. La gran cantidad de hierro presente como hemoglobina significa que la intensidad de cualquier anemia debe valorarse siempre mediante la evaluación del estado del hierro. En la anemia ferropénica hay una reducción global de hierro corporal. Ninguna medición simple del estado de hierro es ideal para todas las circunstancias clínicas porque todas ellas están afectadas por factores de confusión (v. tabla 7.3). La anemia de los trastornos crónicos se asocia con depósitos normales o aumentados (ferritina sérica normal o aumentada) acompañados de un aporte reducido de hierro a los tejidos (bajo hierro sérico y TIBC de baja a normal). Aunque la ferritina sérica es un reactante en fase aguda, los valores inferiores a 50 µg/l se asocian habitualmente con ausencia de depósitos de hierro en la artritis reumatoide, en la nefropatía y en las inflamaciones intestinales. Los valores del receptor sérico de la transferrina pueden también proporcionar una información diagnóstica valiosa en el déficit de hierro por enfermedad crónica.

A pesar de los años de investigación, hay poca información comparativa fiable. La principal razón se debe a la dificultad para distinguir entre la presencia y la ausencia de depósitos de hierro. La mayoría de los investigadores han utilizado el grado de depósito de hierro en la médula ósea como «patrón oro». Éste es un procedimiento invasivo y, por tanto, limita enormemente el número de pacientes investigados. A menudo, es difícil justificar la aspiración de la médula ósea para determinar el estado del hierro de un paciente, siendo incluso más difícil en el caso de voluntarios normales. Además, la aspiración de la médula ósea seguida de la tinción de hierro no es un procedimiento reproducible. Se han descrito errores del observador[100], especímenes inadecuados y falta de correlación con la respuesta a la terapia férrica[101]. La demostración de la respuesta de la Hb a la terapia con hierro oral ha sido el método de elección en la práctica pediátrica.

Anemia ferropénica en los adultos

Casi todas las mediciones muestran una sensibilidad y una especificidad elevada para distinguir entre sujetos con déficit de hierro y aquellos con depósitos de hierro y valores de hemoglobina normales en ausencia de cualquier otro proceso mórbido. Guyatt y cols.[102] realizaron una revisión sistemática del valor diagnóstico de las distintas pruebas de laboratorio para diagnosticar el déficit de hierro. Concluyeron que la ferritina sérica era la prueba más potente para el déficit simple de hierro y también para el déficit de hierro en pacientes hospitalizados. Sin embargo, este análisis no incluía el receptor de la transferrina.

Detección del déficit de hierro en las enfermedades agudas o crónicas

La tabla 7.6 resume diversos estudios en los que se evaluó el hierro de la médula ósea y se comparó la sensibilidad y la especificidad de diversos análisis. A pesar de que los resultados entre los estudios fueron muy diferentes, se pueden extraer algunas conclusiones generales.

Los parámetros eritrocitarios convencionales, el volumen corpuscular medio (VCM) y la hemoglobina corpuscular media no permiten distinguir entre la presencia o la ausencia de hierro en la médula ósea en pacientes con enfermedad crónica. La concentración de hierro sérico es casi invariablemente baja en la enfermedad crónica y, aunque la TIBC (o concentración de la transferrina) es mayor en pacientes sin depósitos de hierro, ni esta medición ni la saturación de la transferrina obtenida a partir del hierro sérico y de la TIBC proporcionan una discriminación útil.

En la enfermedad crónica la concentración de ferritina sérica refleja los valores de los depósitos de hierro, pero éstos son superiores a los de los sujetos normales. Es necesario establecer un umbral de 30-50 µg/l para distinguir entre la presencia y la ausencia de depósitos de hierro. Incluso con este límite la sensibilidad es baja.

Las combinaciones de la ferritina sérica con la velocidad de sedimentación globular (VSG) o con la proteína C reactiva (PCR), ya sea en un análisis discriminante[99] o en una regresión logística[103], proporcionan únicamente una pequeña mejora en la capacidad para detectar la falta de depósitos de hierro.

El valor del receptor sérico de la transferrina permite distinguir entre la presencia y la ausencia de los depósitos

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 7.6. Sensibilidad/especificidad de los métodos para el diagnóstico del déficit de hierro en presencia de enfermedad crónica

En los adultos, los depósitos de hierro se determinan por la tinción de hierro en la médula ósea. Los umbrales óptimos para el diagnóstico seleccionados varían.

Prueba	1	2[a]	3[a]	4	5	6	7	8
Bibliografía	119	120	68	121	123	124	125	
VCM	–	–	0,86	–	–	0,42/0,83	–	–
% Hipo	–	–	–	0,77/0,90	–	–	–	–
Hierro sérico	–	–	0,68	L	–	–	NS	–
TIBC	–	–	0,84[b]	L	–	–	–	–
% Saturación	–	–	0,79[c]	L	–	0,38-0,89	–	–
Ferritina sérica	0,79/0,97	0,870	0,89	0,86/0,90	1,00/0,81	0,25/0,99	0,94/0,95	0,92/0,98
PPC	0,74/0,94		–	L	–	–	–	–
RsTf	0,63/0/81	0,704	0,98	L	1,00/0,84	0,71/0,74	0,61/0,68	0,92/0,84
RsTf/log ferritina	0,74/0,97	0,865	1,00	–	1,00/0,97	0,67/0,93	–	–

L, sensibilidad/especificidad inferior a la de la ferritina sérica, individualmente o en combinación. Las combinaciones de ferritina con velocidad de sedimentación globular o con proteína C reactiva no mejoran la eficiencia; PPC, protoporfirina de cinc; RsTf, receptor sérico de la transferrina; TIBC, capacidad total de fijación de hierro; VCM, volumen corpuscular medio.
Bibliografía en la fila 1: 1, 119; 2, 120; 3, 68; 4, 121; 5, 122; 6, 123; 7, 124; 8, 125.
[a] Área bajo la curva de las características operativas del receptor (ROC).
[b] Concentración de la transferrina (equivalente a la TIBC; v. texto).
[c] Índice de la transferrina (equivalente al % de saturación; v. texto).

de hierro, aunque no hay acuerdo sobre si este análisis es superior al de la ferritina sérica. Diversos estudios muestran que el cociente RsTf/$\log_{10}$ ferritina proporciona una mayor discriminación que cualquiera de las pruebas por sí mismas. El uso del log ferritina reduce la influencia de la ferritina sérica (y, por tanto, la respuesta en fase aguda) sobre el cociente global. Aunque el log [RsTf/ferritina] es una excelente medida de los depósitos de hierro en los sujetos sanos[66], es posible que esta conversión (es decir, tras calcular el cociente de la RsTf/ferritina) no aporte la mejor discriminación para las aplicaciones clínicas. Cuando se disponga del análisis del RsTf en los inmunoanalizadores de alto rendimiento de forma inmediata, el cociente RsTf/log ferritina puede ser el mejor discriminador para identificar la coexistencia del déficit de hierro con la enfermedad crónica. Sin embargo, sería también necesaria la estandarización de unidades e intervalos para los diversos análisis del RsTf si el uso del cociente consiguiese una amplia aceptación.

Déficit funcional de hierro

El déficit funcional de hierro es una situación en la que los depósitos de hierro son aparentemente adecuados, pero el suministro de hierro para la eritropoyesis se mantiene insuficiente. Esto ocurre a menudo durante el tratamiento de pacientes con anemia e insuficiencia renal con eritropoyetina. La clave diagnóstica consiste en identificar aquellos pacientes con un déficit funcional de hierro que requerirán terapia férrica para que respondan a la eritropoyetina con un incremento aceptable de la Hb. El porcentaje de hematíes hipocrómicos es un buen factor de predicción de la respuesta[104]. Fishbane y cols.[105] concluyeron que el contenido en hemoglobina del reticulocito (CHr) era un analito notablemente más estable que la ferritina sérica o que la saturación de la transferrina y predecía el déficit funcional de hierro de forma más eficaz. No incluyeron el porcentaje de células hipocrómicas en sus análisis. Fernández-Rodríguez y cols.[106] evaluaron la sensibilidad y especificidad de la ferritina, la TIBC, el índice de saturación de la transferrina, la ferritina de los hematíes y el RsTf en 63 pacientes con anemia e insuficiencia renal crónica sometidos a diálisis, que no recibían tratamiento con eritropoyetina. El depósito de hierro se evaluó mediante la tinción del hierro de la médula ósea. Para la ferritina sérica, un valor de corte de 121 g/l dio una sensibilidad y una especificidad del 75%. La eficacia fue menor para el RsTf y para la ferritina eritrocitaria. El VCM, el índice de saturación de la transferrina y la TIBC mostraron los valores más bajos para la sensibilidad y la especificidad.

Déficit de hierro en la lactancia y en la infancia

No hay un acuerdo universal sobre los umbrales para el diagnóstico del déficit de hierro y la anemia ferropénica en los lactantes. Durante el primer año de vida, a medida que la hemoglobina fetal es sustituida por la hemoglobina A, se producen cambios rápidos en el estado del hierro. La concentración de ferritina sérica tiene menos utilidad para el

diagnóstico del déficit de hierro que la de los adultos, debido en parte a la rápida reducción de su concentración en los primeros 6 meses y a las bajas concentraciones que se encuentran generalmente en los niños mayores de 6 meses. Domellof y cols.[107] han propuesto valores de corte revisados para el déficit de hierro, incluyendo la ferritina sérica y el RsTf, en lactantes de hasta 1 año de edad.

En niños la razón para detectar el déficit de hierro es identificar a aquellos que responderán a la terapia férrica. Margolis y cols.[108] encontraron que el mejor predictor de la respuesta era la Hb inicial, aunque la sensibilidad era únicamente del 66% y la especificidad del 60%. La ferritina sérica, la saturación de la transferrina y la protoporfirina eritrocitaria (PE) eran incluso menos eficaces y la combinación de las diversas mediciones aportaba pocas mejoras. Hershko y cols.[109] estudiaron a niños de los pueblos de los Altos del Golán (Israel) y llegaron a la conclusión de que la PE era un índice más fiable para el déficit de hierro que la ferritina sérica. Sugirieron que la incidencia significativa de la enfermedad crónica afectaba tanto a los valores de la ferritina como a los del hierro. La PPC representa un indicador útil de la eritropoyesis por déficit de hierro, aunque los valores elevados pueden indicar una intoxicación por plomo más que un déficit de hierro. El pequeño volumen de muestra necesario para la determinación de la PPC constituye también una ventaja en la práctica pediátrica.

Un informe publicado en 2003 confirma el efecto de la infección de baja intensidad sobre las mediciones del estado de hierro. Abraham y cols.[110] estudiaron a 101 lactantes sanos de 11 meses de edad. En la mañana de la toma de las muestras sanguíneas, se observaron ligeros signos clínicos de infección de las vías respiratorias en 42 lactantes. Se realizaron amplios análisis sanguíneos incluyendo la proteína C reactiva (PCR) de alta sensibilidad. La PCR medida por los métodos de rutina dio valores inferiores a los 6 mg/l en todos los lactantes, pero con el análisis de alta sensibilidad, los valores fueron mayores en muchos lactantes con síntomas de infección de las vías respiratorias. La concentración de hierro sérico estaba reducida en estos niños y se correlacionaba de forma significativa con el valor de la PCR. En una toma de muestras sanguíneas posterior, la concentración de ferritina sérica fue mayor en los niños que tenían un valor de PCR más elevado; el hierro sérico se había reducido, pero los valores de RsTf y de transferrina no se habían alterado.

Embarazo

Las concentraciones de ferritina sérica al inicio del embarazo proporcionan una indicación fiable del déficit de hierro. La hemodilución en el segundo y el tercer trimestre del embarazo reduce las concentraciones de todas las mediciones del estado del hierro y esto significa que los valores umbral para el déficit de hierro establecidos en las mujeres no gestantes no son adecuados. En principio, la determinación de los valores como cocientes (PPC umol/mol hemo, la saturación de la transferrina [ST] y el RsTf/ferritina) deberían ser más fiables. En las mujeres sanas, sin anemia, que recibían suplementos de hierro[60], el hierro sérico, la ST y la ferritina sérica se redujeron desde el primer hasta el tercer trimestre y aumentaron tras el parto; la TIBC aumentó durante el embarazo y se redujo tras el parto. Las concentraciones de RsTf mostraron un incremento sustancial (aproximadamente el doble) durante el embarazo, lo que probablemente refleja el aumento de la eritropoyesis[60]. En cambio, Carriaga y cols.[71] notificaron que la concentración media del RsTf en las mujeres embarazadas en el tercer trimestre no difería de la de las mujeres no embarazadas y que la concentración del RsTf no estaba influida por el embarazo en sí mismo. Choi y cols. sugieren que los distintos análisis y las diversas edades de los grupos de control pueden explicar esta discrepancia[60].

CONCLUSIÓN

La mayoría de las veces, el estado de hierro del organismo puede evaluarse teniendo en cuenta la Hb, los índices eritrocitarios y la concentración de ferritina sérica junto con la presencia de signos de inflamación, infección y hepatopatía. El RsTf puede ser útil para distinguir entre la presencia y la ausencia de depósitos de hierro en la anemia por enfermedad crónica, pero su uso está sujeto a limitaciones por la falta de acuerdo sobre las unidades y los intervalos de referencia. La medición de la saturación de la transferrina es esencial para evaluar la acumulación de hierro en la hemocromatosis genética.

BIBLIOGRAFÍA

1. Miret S, Simpson RJ, Mckie AT 2003 Physiology and molecular biology of dietary iron absorption. Annual Review of Nutrition 23:283-301.
2. Cavill I, Worwood M, Jacobs A. 1975 Internal regulation of iron absorption. Nature 256:328-329.
3. Ganz T, 2003 Hepcidin: a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. Blood 102:783-788.
4. Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC 2004 Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. Cell 117:285-297.
5. Harrison PM, Arosio P 1996 Ferritins: Molecular properties, iron storage function and cellular regulation. Bba-Bioenergetics 1275:161-203.
6. Langlois MR, Delanghe JR 1996 Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. Clinical Chemistry 42:1589-600.
7. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C et al 2001 Identification of the haemoglobin scavenger receptor. Nature 409:198-201.
8. Tolosano E, Altruda F 2002 Hemopexin: structure, function, and regulation. DNA and Cell Biology 21:297-306.
9. Worwood M. 1990 Ferritin. Blood Reviews 4:259-269.
10. Hider RC 2002 Nature of nontransferrin-bound iron. European Journal of Clinical Investigation 32:50-54.
11. British Nutrition Foundation. Report of the Task Force 1995 Iron—Nutritional and Physiological Significance. Chapman and Hall, London.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

12. Sullivan JL 1981 Iron and the sex difference in heart disease risk. Lancet 1:1293-1294.
13. Labbe RF, Vreman HJ, Stevenson DK 1999 Zinc protoporphyrin: a metabolite with a mission. Clinical Chemistry 45:2060-2072.
14. Hoffbrand AV, Worwood M 2005 Iron overload. In: Hoffband AV, Tuddenham E, Catovsky D (eds) Postgraduate Haematology. Blackwell Publishing, Oxford.
15. Worwood M, Hoffband AV 2005 Iron metabolism and iron deficiency. In: Hoffband AV, Tuddenham E, Catovsky D (eds) Postgraduate Haematology. Blackwell Publishing, Oxford.
16. Dooley J, Worwood, M. Guidelines on diagnosis and therapy: genetic haemochromatosis 2000 British Committee for Standards in Haematology. www.bcshguidelines.com.
17. Addison GM, Beamish MR, Hales CN et al 1972 An immunoradiometric assay for ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. Journal of Clinical Pathology 25:326-329.
18. Miles LE, Lipschitz DA, Bieber CP, et al 1974 Measurement of serum ferritin by a 2-site immunoradiometric assay. Analytical Biochemistry 61:209-224.
19. ICSH (Expert Panel on Iron) 1985. Proposed international standard of human ferritin for the serum ferritin assay. British Journal of Haematology 61:61-63.
20. Worwood M 1980 Serum ferritin. In: Cook JD (ed) Iron, p. 59-89. Churchill Livingstone, New York.
21. Dresser DW. 1986 Immunization of experimental animals. In: Weir DM (ed) Handbook of Experimental Immunology, p. 8.1-8.21. Blackwell Science, Oxford.
22. Johnson GD, Holborow EJ 1986 Preparation and use of fluorochrome conjugates. In: Weir DM (ed) Handbook of Experimental Immunology, p. 28.1-28.21. Blackwell Science, Oxford.
23. Wilson MB, Nakane PK 1978 Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies In: Knapp W, Houlbar K, Houlbar K (eds) Immunofluorescence and related staining techniques, p. 215-224. Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
24. Perera P, Worwood M 1984 Antigen-binding in the 2-site immunoradiometric assay for serum ferritin—the nature of the hook effect. Annals of Clinical Biochemistry 21:393-397.
25. Boscato LM, Stuart MC 1988 Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clinical Chemistry 34:27-33.
26. Zweig MH, Csako G, Benson CC et al 1987 Interference by anti-immunoglobulin-G antibodies in immunoradiometric assays of thyrotropin involving mouse monoclonal-antibodies. Clinical Chemistry 33:840-844.
27. Worwood M Ferritin in human tissues and serum [Review:167 refs] 1982 Clinics in Haematology 11:275-307.
28. World Health Organization 2001 Iron deficiency anemia. Assessment, prevention, and control. A guide for programme managers, www.who.int/nut/documents/ida_assessment_prevention_control.
29. Witte DL 1991 Can serum ferritin be effectively interpreted in the presence of the acute-phase response? Clinical Chemistry 37:484-485.
30. Rogers JT, Bridges KR, Durmowicz GP et al 1990 Translational control during the acute phase response. Ferritin synthesis in response to interleukin-1. Journal of Biological Chemistry 265:14572-14578.
31. Worwood M 1986 Serum ferritin. Clinical Science 70:215-220.
32. Cavanna F, Ruggeri G, Iacobello C et al 1983 Development of a monoclonal antibody against human heart ferritin and its application in an immunoradiometric assay. Clinica Chimica Acta 134:347-356.
33. Jones BM, Worwood M, Jacobs A 1980 Serum ferritin in patients with cancer: determination with antibodies to HeLa cell and spleen ferritin. Clinica Chimica Acta 106: 203-214.
34. Nielsen P, Gunther U, Durken M et al 2000 Serum ferritin iron in iron overload and liver damage: correlation to body iron stores and diagnostic relevance. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 135:413-418.
35. ICSH 1990 Revised recommendations for the measurement of serum iron in human blood. British Journal of Haematology 75:615-616.
36. Bothwell TH, Charlton RW, Cook JD, et al 1979 Iron metabolism in man. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
37. Persijn J-P, van der Slik W, Riethorst A 1971 Determination of serum iron and latent iron-binding capacity (LIBC). Clinica Chimica Acta 35:91-98.
38. Tietz NW, Rinker AD, Morrison SR 1996 When is a serum iron really a serum iron? A follow-up study on the status of iron measurements in serum. Clinical Chemistry 42:109-111.
39. Blanck HM, Pfeiffer CM, Caudill SP et al 2003 Serum iron and iron-binding capacity: a round-robin interlaboratory comparison study. Clinical Chemistry 49:1672-1675.
40. Jacobs A, Waters WE, Campbell H et al 1969 A random sample from Wales III. Serum iron, iron binding capacity and transferrin saturation. British Journal of Haematology 17:581-587.
41. Jackson HA, Carter K, Darke C, et al 2001 HFE mutations, iron deficiency and overload in 10 500 blood donors. British Journal of Haematology 114:474-484.
42. Koerper MA, Dallman PR 1977 Serum iron concentration and transferrin saturation in the diagnosis of iron deficiency in children: normal developmental changes. Journal of Pediatrics 91:870-874.
43. Saarinen UM, Siimes MA 1977 Developmental changes in serum iron, total iron binding capacity and transferrin saturation in infancy. Journal of Pediatrics 91:877.
44. International Committee for Standardization in Haematology 1978 The measurement of total and unsaturated iron binding capacity in serum. British Journal of Haematology 38:281-290.
45. Siek G, Lawlor J, Pelczar D et al 2002 Direct serum total iron-binding capacity assay suitable for automated analyzers. Clinical Chemistry 48:161-166.
46. Beilby J, Olynyk J, Ching S et al 1992 Transferrin index: an alternative method for calculating the iron saturation of transferrin. Clinical Chemistry 38:2078-2081.
47. Huebers HA, Eng MJ, Josephson BM et al 1987 Plasma iron and transferrin iron-binding-capacity evaluated by colorimetric and immunoprecipitation methods. Clinical Chemistry 33:273-277.
48. Yamanishi H, Iyama S, Yamaguchi Y et al 2003 Total iron-binding capacity calculated from serum transferrin concentration or serum iron concentration and unsaturated iron-binding capacity. Clinical Chemistry 49:175-178.
49. Gambino R, Desvarieux E, Orth M et al 1997 The relation between chemically measured total iron-binding capacity concentrations and immunologically measured transferrin concentrations in human serum. Clinical Chemistry 43: 2408-2412.

50. Murtagh LJ, Whiley M, Wilson S et al 2002 Unsaturated iron binding capacity and transferrin saturation are equally reliable in detection of HFE hemochromatosis. American Journal of Gastroenterology 97:2093-2099.
51. Bainton DF, Finch CA 1964 The diagnosis of iron deficiency anemia. American Journal of Medicine 37:62-70.
52. Edwards CQ, Kushner JP 1993 Screening for hemochromatosis. New England Journal of Medicine 328:1616-1620.
53. Feelders RA, Kuiperkramer EPA, Vaneijk HG 1999 Structure, function and clinical significance of transferrin receptors. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 37:1-10.
54. Trinder D, Baker E 2003 Transferrin receptor 2: a new molecule in iron metabolism. International Journal of Biochemistry & Cell Biology 35:292-296.
55. Kohgo Y, Nishisato T, Kondo H et al 1986 Circulating transferrin receptor in human serum. British Journal of Haematology 64:277-281.
56. Cook JD 1999 The measurement of serum transferrin receptor. American Journal of the Medical Sciences 318:269-276.
57. Worwood M, Ellis RD, Bain BJ 2000 Three serum transferrin receptor ELISAs. MDA/2000/09. Her Majesty's Stationary Office, Norwich, UK.
58. Akesson A, Bjellerup P, Vahter M 1999 Evaluation of kits for measurement of the soluble transferrin receptor. Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation 59:77-81.
59. Kuiperkramer EPA, Huisman CMS, Vanraan J et al 1996 Analytical and clinical implications of soluble transferrin receptors in serum. European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry 34:645-649.
60. Choi JW, Im MW, Pai SH 2000 Serum transferrin receptor concentrations during normal pregnancy. Clinical Chemistry 46:725-727.
61. Kohgo Y, Niitsu Y, Kondo H et al 1987. Serum transferrin receptor as a new index of erythropoiesis. Blood 70:1955-1958.
62. Huebers HA, Beguin Y, Pootrakul PN et al 1990 Intact transferrin receptors in human plasma and their relation to erythropoiesis. Blood 75:102-107.
63. Beguin Y, Clemons GK, Pootrakul P et al 1993 Quantitative assessment of erythropoiesis and functional classification of anemia based on measurements of serum transferrin receptor and erythropoietin. Blood 81:1067-1076.
64. Cavill I, Ricketts C 1980 Human iron kinetics. In: Jacobs A, Worwood M (eds) Iron in Biochemistry and Medicine II, p. 573, Academic Press, London.
65. Skikne B, Flowers CH, Cook JD 1990 Serum transferrin receptor: a quantitative measure of tissue iron deficiency. Blood 75:1870-1876.
66. Cook JD, Flowers CH, Skikne BS 2003 The quantitative assessment of body iron. Blood 101:3359-3364.
67. Olivares M, Walter T, Cook JD et al 2000 Usefulness of serum transferrin receptor and serum ferritin in diagnosis of iron deficiency in infancy. American Journal of Clinical Nutrition 72:1191-1195.
68. Punnonen K, Irjala K, Rajamaki A 1997 Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. Blood 89:1052-1057.
69. Kuiperkramer PA, Huisman CMS, Vandermolensinke J et al 1997 The expression of transferrin receptors on erythroblasts in anaemia of chronic disease, myelodysplastic syndromes and iron deficiency. Acta Haematologica 97: 127-131.
70. Fitzsimons EJ, Houston T, Munro R et al 2002 Erythroblast iron metabolism and serum soluble transferrin receptor values in the anemia of rheumatoid arthritis. Arthritis & Rheumatism—Arthritis Care & Research 47:166-171.
71. Carriaga MT, Skikne BS, Finley B et al 1991 Serum transferrin receptor for the detection of iron deficiency in pregnancy. American Journal of Clinical Nutrition 54:1077-1081.
72. Akesson A, Bjellerup P, Berglund M et al 1998 Serum transferrin receptor: a specific marker of iron deficiency in pregnancy. American Journal of Clinical Nutrition 68: 1241-1246.
73. Vandenbroek NR, Letsky EA, White SA et al 1998 Iron status in pregnant women: which measurements are valid? British Journal of Haematology 103:817-824.
74. Baynes RD, Cook JD, Bothwell TH et al 1994 Serum transferrin receptor in hereditary hemochromatosis and African siderosis. American Journal of Hematology 45:288-292.
75. Khumalo H, Gomo ZAR, Moyo VM et al 1998 Serum transferrin receptors are decreased in the presence of iron overload. Clinical Chemistry 44:40-44.
76. Looker AC, Loyevsky M, Gordeuk VR 1999 Increased serum transferrin saturation is associated with lower serum transferrin receptor concentration. Clinical Chemistry 45:2191-2199.
77. Hastka J, Lasserre JJ, Schwarzbeck A et al 1993 Zinc protoporphyrin in anemia of chronic disorders. Blood 81: 1200-1204.
78. Yip R 1994 Changes in iron metabolism with age. In: Brock JH, Halliday JW, Pippard MJ et al (eds) Iron metabolism in health and disease, p. 427-448. WB Saunders, London.
79. Hastka J, Lasserre JJ, Schwarzbeck A et al 1992 Washing erythrocytes to remove interferents in measurements of zinc protoporphyrin by front-face hematofluorometry. Clinical Chemistry 38:2184-2189.
80. Garrett S, Worwood M 1994 Zinc protoporphyrin and iron deficient erythropoiesis. Acta Haematologica 191:21-25.
81. Soldin OP, Miller M, Soldin SJ 2003. Pediatric reference ranges for zinc protoporphyrin. Clinical Biochemistry 36:21-25.
82. Zanella A, Gridelli L, Berzuini A et al 1989 Sensitivity and predictive value of serum ferritin and free erythrocyte protoporphyrin for iron-deficiency. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 113:73-78.
83. Dawkins S, Cavill I, Ricketts C et al 1979 Variability of serum ferritin concentration in normal subjects. Clinical & Laboratory Haematology 1:41-46.

83a. Dale JC, Burritt MF, Zinsmeister AR 2002 Diurnal variation of serum iron, iron-binding capacity, transferrin saturation and ferritin levels. American Journal of Clinical Pathology 117:802-808.

84. Borel MJ, Smith SM, Derr J et al 1991 Day-to-day variation in iron-status indices in healthy men and women. American Journal of Clinical Nutrition 54:729-735.
85. Pootrakul P, Skikne BS, Cook JD 1983 The use of capillary blood for measurements of circulating ferritin. American Journal of Clinical Nutrition 37:307-310.
86. Cooper MJ, Zlotkin SH 1996 Day-to-day variation of transferrin receptor and ferritin in healthy men and women. American Journal of Clinical Nutrition 64:738-742.
87. Kim I, Yetley EA, Calvo MS 1993 Variations in iron-status measures during the menstrual-cycle. American Journal of Clinical Nutrition 58:705-709.
88. Lundberg PA, Lindstedt G, Andersson T et al 1984 Increase in serum ferritin concentration induced by fasting. Clinical Chemistry 30:161-163.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

89. Chapman RW, Gorman A, Laulicht M et al 1982 Binding of serum ferritin to concanavalin A in patients with iron overload and with chronic liver disease. Journal of Clinical Pathology 35:481-486.
90. Nikolaidis MG, Michailidis Y, Mougios V 2003 Variation of soluble transferrin receptor and ferritin concentrations in human serum during recovery from exercise. European Journal of Applied Physiology 89:500-502.
91. Fallon KE 2001 The acute phase response and exercise: the ultramarathon as prototype exercise. Clinical Journal of Sport Medicine 11:38-43.
92. Stupnicki R, Malczewska J, Milde K et al 2003 Day to day variability in the transferrin receptor/ferritin index in female athletes. British Journal of Sports Medicine 37:267-269.
93. Kristalboneh E, Froom P, Harari G et al 1993 Seasonal changes in red-blood-cell parameters. British Journal of Haematology 85:603-607.
94. Maes M, Bosmans E, Scharpe S et al 1997 Components of biological variation in serum soluble transferrin receptor: relationships to serum iron, transferrin and ferritin concentrations, and immune and haematological variables. Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation 57:31-41.
95. Dallman PR 1984 Diagnosis of anemia and iron-deficiency: analytic and biological variations of laboratory tests. American Journal of Clinical Nutrition 39:937-941.
96. Looker AC, Dallman PR, Carroll MD et al 1997 Prevalence of iron deficiency in the United States. Journal of the American Medical Association 277:973-976.
97. Wiggers P, Dalhoj J, Hyltoft Petersen P et al 1991 Screening for haemochromatosis: influence of analytical imprecision, diagnostic limit and prevalence on test validity. Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation 51:143-148.
98. Lammikeefe CJ, Lickteig ES, Ahluwalia N et al 1996 Day-to-day variation in iron status indexes is similar for most measures in elderly women with and without rheumatoid arthritis. Journal of the American Dietetic Association 96:247-251.
99. Ahluwalia N, Lammikeefe CJ, Bendel RB et al 1995 Iron-deficiency and anemia of chronic disease in elderly women: a discriminant-analysis approach for differentiation. American Journal of Clinical Nutrition 61:590-596.
100. Bentley DP, Williams P 1974 Serum ferritin concentration as an index of storage iron in rheumatoid arthritis. Journal of Clinical Pathology 27:786-738.
101. Tessitore N, Solero GP, Lippi G et al 2001 The role of iron status markers in predicting response to intravenous iron in haemodialysis patients on maintenance erythropoietin. Nephrology Dialysis Transplantation 16:1416-1423.
102. Guyatt G, Oxman AD, Ali M et al 1992 Laboratory diagnosis of iron-deficiency anemia—an overview. Journal of General Internal Medicine 7:145-153.
103. Kotru M, Rusia U, Sikka M et al 2004 Evaluation of serum ferritin in screening for iron deficiency in tuberculosis. Annals of Hematology 83:95-100.
104. Macdougall IC, Cavill I, Hulme B et al 1992 Detection of functional iron-deficiency during erythropoietin treatment: a new approach. British Medical Journal 304:225-226.
105. Fishbane S, Shapiro W, Dutka P et al 2001 A randomized trial of iron deficiency testing strategies in hemodialysis patients. Kidney International 60:2406-2411.
106. Fernandez-Rodriguez AM, Guindeo-Casasus MC, Molero-Labarta T et al 1999 Diagnosis of iron deficiency in chronic renal failure. American Journal of Kidney Diseases 34:508-513.
107. Domellof M, Dewey KG, Lonnerdal B et al 2002 The diagnostic criteria for iron deficiency in infants should be reevaluated. Journal of Nutrition 132:3680-3686.
108. Margolis HS, Huntley HH, Bender TR et al 1981 Iron deficiency in children: the relationship between pretreatment laboratory tests and subsequent hemoglobin response to iron therapy. American Journal of Clinical Nutrition 34: 2158-2168.
109. Hershko C, Baror D, Gaziel Y et al 1981 Diagnosis of iron-deficiency anemia in a rural-population of children: relative usefulness of serum ferritin, red-cell protoporphyrin, red-cell indexes, and transferrin saturation determinations. American Journal of Clinical Nutrition 34:1600-1610.
110. Abraham K, Muller C, Gruters A et al 2003 Minimal inflammation, acute phase response and avoidance of misclassification of vitamin A and iron status in infants: importance of a high-sensitivity C-reactive protein (CRP) assay. International Journal for Vitamin and Nutrition Research 73:423-430.
111. Brittenham GM 1988 Noninvasive methods for the early detection of hereditary hemochromatosis. [Review]. Annals of the New York Academy of Sciences 526:199-208.
112. Gallagher SK, Johnson LK, Milne DB 1989 Short-term and long-term variability of indexes related to nutritional-status. I. Ca, Cu, Fe, Mg, and Zn. Clinical Chemistry 35:369-373.
113. Statland BE, Winkel P 1977 Relationship of day-to-day variation of serum iron concentration to iron-binding capacity in healthy young women. American Journal of Clinical Pathology 67:84-90.
114. Statland BE, Winkel P, Bokieland H 1976 Variation of serum iron concentration in healthy young men: within day and day-to-day changes. Clinical Biochemistry 9:26-29.
115. Statland BE, Winn RK, Harris SC 1977 Evaluation of biologic sources of variation of leucocyte counts and other hematologic quantities using very precise automated analysers. American Journal of Clinical Pathology 69:48-54.
116. Pilon VA, Howantitz PJ, Howanitz JH et al 1981 Day-to-day variation in serum ferritin concentration in healthy subjects. Clinical Chemistry 27:78-82.
117. Romslo I, Talstad I 1988 Day-to-day variations in serum iron, serum iron binding capacity, serum ferritin and erythrocyte protoporphyrin concentrations in anaemic subjects. European Journal of Haematology 40:79-82.
118. Ahluwalia N 1998 Diagnostic utility of serum transferrin receptors measurement in assessing iron status. Nutrition Reviews 56:133-141.
119. van Tellingen A, Kuenen JC, de Kieviet W et al 2001 Iron deficiency anaemia in hospitalised patients: value of various laboratory parameters—differentiation between IDA and ACD. Netherlands Journal of Medicine 59:270-279.
120. Lee EJ, Oh EJ, Park YJ et al 2002 Soluble transferrin receptor (sTfR), ferritin, and sTfR/log ferritin index in anemic patients with nonhematologic malignancy and chronic inflammation. Clinical Chemistry 48:1118-1121.
121. Kurer SB, Seifert B, Michel B et al 1995 Prediction of iron deficiency in chronic inflammatory rheumatic disease anaemia. British Journal of Haematology 91:820-826.
122. Bultink IEM, Lems WF, de Stadt RJV et al 2001 Ferritin and serum transferrin receptor predict iron deficiency in anemic patients with rheumatoid arthritis. Arthritis and Rheumatism 44:979-981.

123. Means RT, Allen J, Sears DA et al 1999 Serum soluble transferrin receptor and the prediction of marrow iron results in a heterogeneous group of patients. Clinical & Laboratory Haematology 21:161-167.
124. Joosten E, Van Loon R, Billen J et al 2002 Serum transferrin receptor in the evaluation of the iron status in elderly hospitalized patients with anemia. American Journal of Hematology 69:1-6.
125. Mast AE, Blinder MA, Gronowski AM et al 1998 Clinical utility of the soluble transferrin receptor and comparison with serum ferritin in several populations. Clinical Chemistry 44:45-51.
126. Pippard MJ 2003 Iron-deficiency anemia, anemia of chronic disorders, and iron overload. In: Wickramasinghe SL, McCullough J (eds) Blood and bone marrow pathology, p. 203-228, Churchill Livingstone, London.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

8 Investigación del estado de la cobalamina, el folato y los metabolitos en la anemia megaloblástica

Malcolm Hamilton y Sheena Blackmore

Características hematológicas de la anemia megaloblástica 140
Investigación de la sospecha de déficit de cobalamina o de folato 141
Métodos de análisis de la cobalamina y del folato 148
Análisis de la fijación competitiva a proteínas 149
Análisis de la vitamina B_{12} sérica 149
Métodos para el folato sérico 150
Métodos para el folato eritrocitario 150
Pruebas para los metabolitos originados en las rutas metabólicas de la cobalamina y del folato 152
Determinación del ácido metilmalónico 152
Determinación de la homocisteína 152
Determinación del anticuerpo antifactor intrínseco 154
Investigación de la absorción de la vitamina B_{12} 155
Secreción urinaria (prueba de Schilling) 155
Capacidad de fijación de la vitamina B_{12} del suero o del plasma: determinación de la transcobalamina 156
Capacidad de fijación de la vitamina B_{12} no saturada e identificación y cuantificación de la transcobalamina 156
Análisis de la holotranscobalamina 156

La investigación del estado del folato y de la vitamina B_{12} en los individuos no está restringida a la investigación de aquellos que presentan las características clásicas de la anemia megaloblástica sola, ya que en el déficit de B_{12} se pueden producir cambios neuropáticos y neuropsiquiátricos en ausencia de macrocitosis o de anemia[1-4]. El hallazgo de que el suplemento de folato reducía la incidencia de los defectos del tubo neural[5] subrayó la importancia de definir los valores óptimos de folato en la población. Se ha postulado que los valores elevados de homocisteína plasmática y de ácido metilmalónico (AMM) séricos podrían ser indicadores sensibles del déficit, incluso subclínico, de folato y de cobalamina[6], a pesar de que en el pasado la determinación a gran escala de los valores de los metabolitos en la práctica rutinaria del laboratorio estaba limitada debido a las dificultades técnicas de su análisis. El aumento de la homocisteína es un factor de riesgo independiente de enfermedad vascular[7] y se asocia con el riesgo de presentar una trombosis venosa idiopática[8]. La implantación del folato como suplemento dietético para reducir los valores de homocisteína, en un intento de evitar el infarto de miocardio y el ictus, contribuirá al desarrollo del análisis de la homocisteína. Los valores aumentados de homocisteína plasmática se producen, tanto en el déficit de B_{12} como en el de folato, por reducción en la síntesis de metionina y por acumulación resultante de homocisteína. Por tanto, la investigación actual en los laboratorios del estado de la vitamina B_{12} y del folato incluye, actualmente, la determinación de la homocisteína. Estas investigaciones abarcan no solamente a los individuos sospechosos de tener déficit o excesos clínicos específicos, sino también a los estudios poblacionales en los que la definición de los valores de referencia de los analitos es crucial.

Las limitaciones de las mediciones de la vitamina B_{12} sérica total se han puesto de manifiesto gracias a estudios que mostraban una especificidad de sólo el 50% (es decir, personas sanas con un valor bajo o con valores de cobalamina bajos sin evidencia de déficit) y una sensibilidad del 95% (es decir, 5% de personas clínicamente deficitarias con un valor normal)[9-11]. Algunos autores han postulado la determinación de metabolitos como el ácido metilmalónico (AMM) en suero u orina y la homocisteína plasmática para contribuir a evaluar el estado de la cobalamina[11]. Aunque la determinación del AMM no está aún muy extendida, pues requiere una espectrometría de masas-cromatografía en fase gaseosa (EM-CG), la determinación de homocisteína puede llevarse a término mediante cromatografía en fase líquida de alta resolución (HPLC) y por inmunoanáli-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

sis enzimáticos comerciales. Además, también se han comercializado[a] *kits* para la determinación de la fracción menor, fisiológicamente activa, de la cobalamina, es decir, la holotranscobalamina[12,13] (complejo B_{12} transcobalamina II). Como marcador precoz y sensible del déficit de cobalamina, la holotranscobalamina puede ofrecer algunas ventajas sobre la determinación de la B_{12} sérica total, que comprende fundamentalmente el complejo B_{12} transcobalamina I (haptocorrina). Estas herramientas diagnósticas adicionales pueden facilitar un diagnóstico más preciso en aquellos pacientes en los que la terapia prolongada pueda haberse iniciado de forma inadecuada y mantenido innecesariamente o, al contrario, haberse suspendido de forma impropia debido a la falta de confianza en la evaluación original.

CARACTERÍSTICAS HEMATOLÓGICAS DE LA ANEMIA MEGALOBLÁSTICA

La anemia megaloblástica, resultante de una síntesis alterada del ADN, se caracteriza por la presencia de precursores de hematíes megaloblásticos en la médula ósea y, en ocasiones, también en la sangre. Los megaloblastos tienen un patrón característico de la cromatina (fig. 8.1) y un aumento del citoplasma como consecuencia de la asincronía entre la madurez nuclear y la citoplasmática, con una relativa inmadurez del núcleo para el grado de hemoglobinización citoplasmática. El retraso en la maduración nuclear, producido por la dilación en la síntesis del ADN a consecuencia de la falta de vitamina B_{12} o de folato, se observa también en todas las series, sobre todo en los precursores granulocíticos medulares, con metamielocitos gigantes (fig. 8.2) y en los neutrófilos multilobulados con aumento tanto del tamaño lobular como del número de segmentos nucleares (v. fig. 5.10, pág. 73). En la anemia perniciosa grave se produce un incremento progresivo en el volumen corpuscular medio (VCM) de hasta 130 fl, con macrocitos ovales, poiquilocitos e hipersegmentación de los neutrófilos (más del 5% con más de 5 lóbulos nucleares)[14,15]. El volumen plaquetario medio está reducido y hay un aumento de la anisocitosis plaquetaria, detectada por la amplitud de la distribución plaquetaria (ADP). El VCM cae hasta los 110-120 fl a medida que los cambios megaloblásticos avanzan. En los hematíes se observan cuerpos de Howell-Jolly y punteado basófilo.

Diagnóstico diferencial de la anemia macrocítica

Los hematíes macrocíticos se observan también en la mielodisplasia, que puede sospecharse por la presencia de neutrófilos hipogranulares o de monocitosis. El consumo excesivo de alcohol produce un aumento del VCM por la presencia de macrocitos redondeados, aunque éstos raramente sobrepasan los 110 fl a menos que coexistan con un

[a] Axis Shield HoloTC RIA 50356/50349/50346. Véase la información del producto en www.axis-shield.com/product.

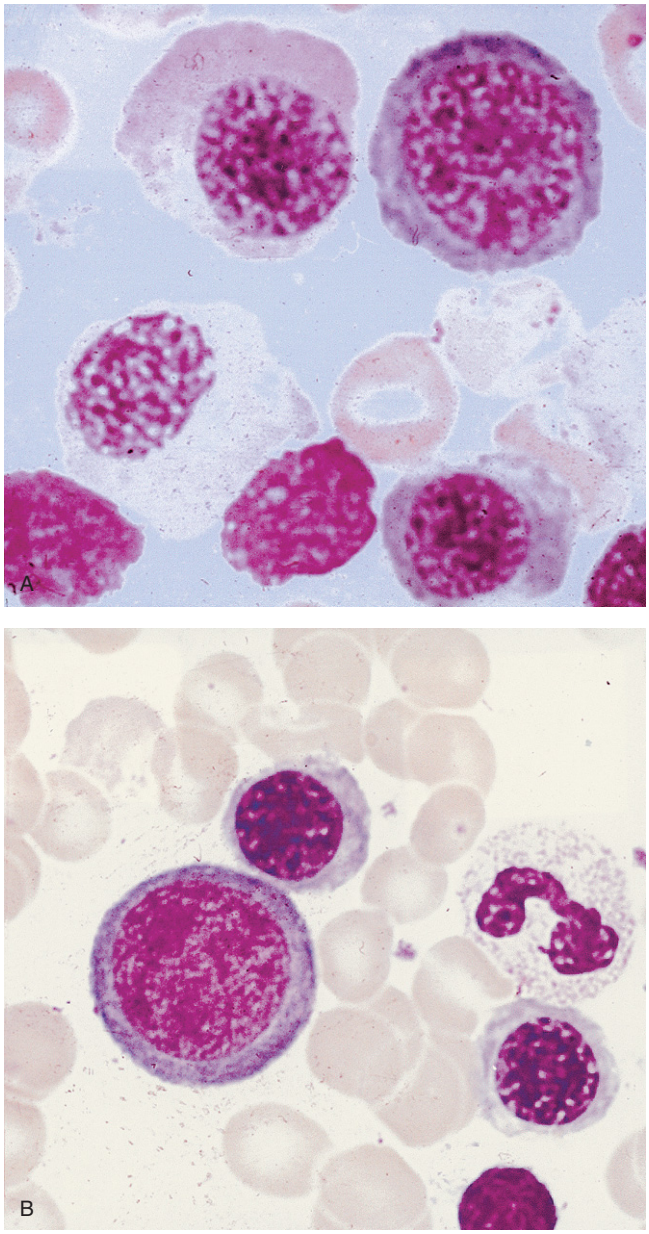


Figura 8.1. Microfotografías de extensiones de la médula ósea teñidas con May-Grünwald-Giemsa. A: megaloblastos; B: normoblastos para la comparación.

déficit de folato. El hipotiroidismo, las hepatopatías, la anemia aplásica, la infrecuente aciduria orótica hereditaria o el síndrome de Lesch-Nyhan cursan también con un VCM elevado. Los recuentos automatizados de reticulocitos facilitan la detección de la producción aumentada de hematíes y del VCM elevado como consecuencia de hemólisis o de hemorragia. El déficit de hierro o el rasgo talasémico coexistentes pueden enmascarar los cambios macrocíticos, aunque el aumento de la amplitud de la distribución eritrocitaria indica anisocitosis y la necesidad de revisar la extensión sanguínea. Las anemias diseritropoyéticas congénitas tipo I y III y la eritroleucemia presentan algunas características de la eritropoyesis megaloblástica no rela-

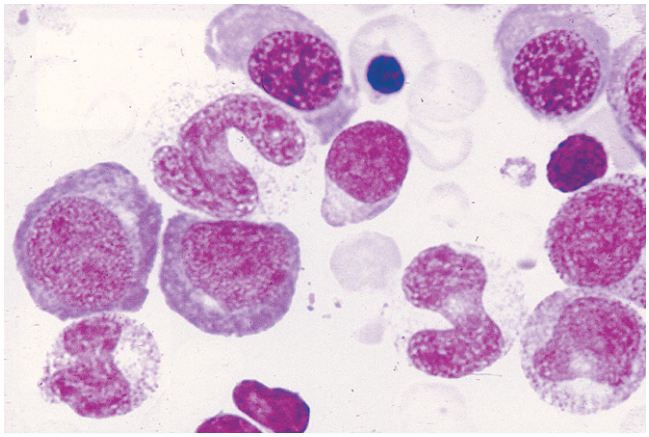


Figura 8.2. Microfotografía de extensión de la médula ósea teñida con May-Grünwald-Giemsa en la que se observan metamielocitos gigantes.

cionadas con la vitamina B_{12} y el folato. Los fármacos que interfieren con la síntesis del ADN (p. ej., la azatioprina, la azidotimidina [AZT] o la hidroxicarbamida) producen una macrocitosis y una eritropoyesis megaloblástica. La terapia anticomicial interfiere con el metabolismo del folato[16], mientras que el impacto de los anticonceptivos orales en la absorción y el metabolismo del folato es controvertido[17]. La anestesia prolongada con óxido nitroso destruye la metilcobalamina y origina un cambio megaloblástico agudo[18].

INVESTIGACIÓN DE LA SOSPECHA DE DÉFICIT DE COBALAMINA O DE FOLATO

Los análisis microbiológicos de cobalamina y de folato y los análisis de fijación competitiva por dilución de radioisótopos para la determinación de la cobalamina y del folato, que a menudo se realizaban conjuntamente, se han sustituido en gran medida por pruebas separadas, consistentes en análisis de fijación automatizados. La aplicación de una estrategia adecuada de las pruebas que se deben realizar en los pacientes que se sospecha que pueden presentar un déficit de cobalamina o de folato se muestra en las tablas 8.1 a 8.3.

La tabla 8.1 indica los detalles clínicos de importancia que deben obtenerse del clínico e incorporados al formulario de petición para ayudar al laboratorio en la interpretación de los resultados numéricos de los análisis de cobalamina y de folato. De forma ideal, las peticiones de analítica no deberían aceptarse sin esta información aunque ello no siempre sea factible.

En la tabla 8.2 se enumeran los estudios de laboratorio más importantes que deben realizarse: los resultados no deben comunicarse por separado de otros resultados de laboratorio y de los detalles clínicos. Si los análisis se hacen en laboratorios diferentes, se requiere el acceso a todos los datos de laboratorio del paciente en cuestión para la autorización y la emisión de los resultados. Los sistemas de información del laboratorio deben facilitar este acceso interdisciplinario.

La tabla 8.3 proporciona una lista de las características clínicas y de laboratorio para el diagnóstico de la anemia perniciosa. Estos criterios evitan la confianza indebida basada en un único análisis de vitamina B_{12} y deberían ayudar a los clínicos a hacer el diagnóstico incluso cuando no se dispone de las pruebas críticas.

Teniendo en cuenta la falta de especificidad y de sensibilidad de los análisis de la cobalamina sérica y la frecuente falta de disponibilidad de otras pruebas diagnósticas, establecer el diagnóstico de anemia perniciosa, que requiere la terapia con vitamina B_{12} por vía parenteral durante toda la vida, basándose únicamente en los resultados de laboratorio, no es una tarea sencilla. Una lista de comprobación de los criterios diagnósticos clínicos y de laboratorio, como la que se muestra en la tabla 8.3, ayuda a alcanzar un mayor grado de certeza diagnóstica que con cualquier prueba diagnóstica aislada y permite realizar el diagnóstico incluso cuando no se dispone de resultados o éstos son anómalos. De esta forma, los criterios clínicos y otros criterios de laboratorio proporcionan pruebas adicionales de una etiología autoinmune, incluso cuando no se cumplan los criterios de diagnóstico de laboratorio más exigentes.

Dificultades clínicas y diagnósticas en la investigación del déficit de cobalamina y de folato

El folato sérico se altera con los cambios dietéticos agudos y debido a la interrupción del ciclo enterohepático; su valor puede, por tanto, ser bajo sin que haya un déficit tisular significativo[19]. Esto puede ser un problema importante en los pacientes hospitalizados. Inicialmente se postuló que el folato de los hematíes se correlacionaba mejor con los cambios megaloblásticos[20], que reflejan el estado del folato a lo largo de la vida de los hematíes (2-3 meses), pero un estudio posterior sugirió que se había ganado poco con la adición del análisis del folato eritrocitario[21] porque únicamente el 14% de los pacientes con folato sérico bajo tenían también valores bajos de folato eritrocitario[19]. Las pequeñas hemólisis *in vitro* pueden causar elevaciones falsas de los valores del folato sérico. Más de la mitad de los pacientes con déficit grave de cobalamina tienen un folato eritrocitario bajo, resultado de la falta de cobalamina como cofactor en la captación del monoglutamato metiltetrahidrofolato (MTHF) por las células y de la síntesis de los folatos poliglutamatos en el interior de las células[22,23], con el correspondiente folato sérico normal o elevado. El tratamiento con cobalamina sola corregirá el folato eritrocitario bajo y los valores elevados de folato sérico. La preocupación sobre la variabilidad intermétodos existente entre los análisis del folato eritrocitario y las dudas sobre los beneficios adicionales[24] de la determinación del folato eritrocitario y del sérico han reducido la utilización de estos análisis. Sin embargo, es posible obtener resultados satisfactorios si la preparación preanalítica de la muestra y su análisis se hacen con el cuidado adecuado. El 5-MTHF es una sustancia muy lá-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 8.1. Significado de los detalles clínicos

Síntomas o signos	Significado posible
Cansancio, palpitaciones, palidez	Anemia
Ictericia ligera	Eritropoyesis ineficaz
Neurológico	
Alteración cognitiva, atrofia óptica, pérdida del sentido de la vibración y del sentido de la posición articular; respuestas plantares normales o anormales; disminución de los reflejos tendinosos.	Déficit de cobalamina, degeneración combinada subaguda de la médula espinal y neuropatías periféricas sensoriales/motoras
Antecedentes gastrointestinales y dietéticos	
Vegetariano; mala nutrición (p. ej., dieta de té y tostadas en ancianos o en estudiantes); dietas de moda	Depósitos bajos de hierro y déficit de hierro. Déficit de cobalamina en recién nacidos de madres vegetarianas Déficit de folato (a menudo con déficit de hierro)
Pérdida de peso, hinchazón y esteatorrea, movimientos intestinales sobre todo nocturnos	Característico del déficit de folato y de la enfermedad de Crohn
Úlceras bucales, dolor abdominal, úlceras perianales, fístulas en la enfermedad de Crohn	Enfermedad de Crohn del íleon terminal, déficit de cobalamina
Glositis, queilosis angular y coiloniquias, antecedentes alcohólicos	Déficit de cobalamina Déficit de hierro coexistente Dieta pobre e interferencia con el metabolismo del folato
Antecedentes de enfermedad autoinmunitaria en el paciente o en la familia	
Hipotiroidismo, anemia perniciosa o enfermedad celíaca	Aumento de la probabilidad de anemia perniciosa o enfermedad celíaca
Cirugía	
Gastrectomía/resección intestinal	Déficit de cobalamina habitualmente a los 2 años de una gastrectomía Enfermedad ileal causante de un déficit de cobalamina Síndrome del asa ciega
Aspecto físico	
Cabello gris, ojos azules, vitíligo	Relación con anemia perniciosa
Embarazo	Requisitos aumentados de hierro y de folato Los valores de cobalamina se reducen en un 30% en el tercer trimestre
Síndrome de malabsorción	
Esprúe tropical, sobrecrecimiento bacteriano, tenia del pescado en países escandinavos	Déficit combinado de folato y de hierro Déficit de cobalamina
Antecedentes farmacológicos	Véase texto
Otros trastornos hematológicos	
Trastornos mieloproliferativos, anemias hemolíticas, leucemias	El aumento de la utilización de folato puede producir un déficit de folato
Mieloma	Interferencia de la paraproteína con los análisis de cobalamina originando unos valores de cobalamina falsamente bajos, que se normalizan con el tratamiento del mieloma

Tabla 8.2. Pruebas de laboratorio en la sospecha de déficit de cobalamina o de folato

Pruebas diagnósticas	Características diagnósticas sugestivas de anomalía de la cobalamina o del folato	Ayudarán a excluir	Dificultades
Hemograma	Macrocitosis	—	Puede no haber macrocitosis ni anemia a pesar de la neuropatía
Extensión sanguínea	Macrocitos ovales, neutrófilos hipersegmentados (>5% con >5 lóbulos). Los cuerpos de Howell-Jolly sugieren hipoesplenismo y por tanto enfermedad celíaca como causa del déficit	Síndrome mielodisplásico (hipogranulares o neutrófilos hipolobulados, hematíes dismórficos) abuso del alcohol/ hepatopatía (macrocitos redondos, células diana, estomatocitos), anemia hemolítica (v. cap. 5)	No siempre hay neutrófilos hipersegmentados; pueden aparecer durante la terapia citotóxica
Recuento de reticulocitos	Recuento absoluto bajo pretratamiento	La respuesta de los reticulocitos en el día 6 después de la terapia confirma la respuesta a la terapia con folato o con B_{12} siempre que sólo se hayan dado dosis bajas	La respuesta reticulocitaria puede estar inhibida en caso de depósitos de hierro inadecuados
Aspirado de la médula ósea (incluyendo la tinción de Perls) antes del tratamiento o en las 24 h de la terapia con folato o con cobalamina, indicada en caso de anemia macrocítica inexplicable de gravedad	Eritropoyesis megaloblástica, metamielocitos gigantes, neutrófilos hipersegmentados, sideroblastos infrecuentes	Síndromes mielodisplásicos, anemia aplásica	El cambio megaloblástico no es necesariamente el resultado de un déficit; puede ser inducido por fármacos o una característica de un síndrome mielodisplásico
B_{12} sérica	La B_{12} < 180 ng/l sugestiva de un déficit de cobalamina puede ser el resultado de una anemia perniciosa, vegetarianismo o gastrectomía; en ausencia de estas causas, puede originarse por malabsorción de la B_{12} unida a la proteína (p. ej., como resultado de una aclorhidria)	La B_{12} < 180 ng/l sin signos o síntomas clínicos y con AMM y homocisteína normales confirma los valores falsamente bajos de la B_{12}, que pueden ser el resultado de un déficit de folato; administrar ácido fólico y controlar el valor de la B_{12} a menos que haya una neuropatía	La B_{12} > 180 ng/l pero con presencia de neuropatía o fuerte sospecha clínica de déficit de B_{12} requiere un ensayo terapéutico o pruebas adicionales, como las del AMM y la homocisteína: si están aumentadas, tratar con B_{12} y controlar la respuesta mediante la repetición de los valores de los metabolitos en el día 6; el déficit de B_{12} se confirma si los valores disminuyen con el tratamiento
Folato sérico	Valor bajo, sobre todo si el folato eritrocitario está también bajo		Sujetos a variaciones diurnas. Los valores bajos pueden ser el resultado de un deterioro reciente de la dieta
Folato eritrocitario	Valor bajo, sobre todo si se ha excluido el déficit de B_{12}		En el déficit de cobalamina el folato eritrocitario es bajo y el folato sérico elevado: tratar con B_{12}
			Los análisis de folato pueden presentar respuestas diferentes al ácido fólico en comparación con el MTHF Puede que los análisis no estén optimizados para la matriz de los hemolizados La definición del intervalo de referencia requiere un método de referencia y estudios poblacionales

(Continúa)

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 8.2. Pruebas de laboratorio en la sospecha de déficit de cobalamina o de folato *(cont.)*

Pruebas diagnósticas	Características diagnósticas sugestivas de anomalía de la cobalamina o del folato	Ayudarán a excluir	Dificultades
Prueba del anticuerpo antifactor intrínseco (puede realizarse como prueba refleja cuando la B_{12} sérica está significativamente reducida)	Positiva en el 50-60% de los casos de anemia perniciosa y, si es positiva, evita la prueba de Schilling		Falso positivo (raro). Negativa en el 40-50% de los casos de anemia perniciosa; si es negativa, realizar la prueba de Schilling
Prueba de Schilling (parte I, prueba básica; parte II, con factor intrínseco; parte III, tras una tanda de antibióticos)	Parte I <5% y parte II normal o cerca de lo normal confirma la malabsorción como resultado de la falta del factor intrínseco (p. ej., anemia perniciosa) Las partes I y II anómalas sugieren malabsorción no originada por el déficit de factor intrínseco[a]		Sin validez en la insuficiencia renal. La parte II puede no ser correcta en la anemia perniciosa si hay presentes anticuerpos antifactor intrínseco en concentraciones elevadas en el jugo gástrico
Endoscopia gastrointestinal superior y biopsia duodenal[b]	Atrofia vellosa en la enfermedad celíaca		
Gastrina sérica o pH del jugo gástrico	Gastrina sérica elevada o pH del jugo gástrico >6 confirma la aclorhidria: si no están presentes, desconfiar del diagnóstico de anemia perniciosa		
AMM sérico y/o homocisteína plasmática antes del tratamiento o antes y 6 días después del tratamiento[c]	Homocisteína elevada en el déficit de folato y de B_{12}; AMM elevado en el déficit de B_{12}, lo que ayuda a confirmar el déficit si la B_{12} está baja y no hay anticuerpos anti-FI	La falta de importancia de una B_{12} baja viene indicada por los valores de AMM y de homocisteína normales en ausencia de signos clínicos	Tanto el AMM como la homocisteína están elevados en la alteración renal

AMM, ácido metilmalónico; MTHF, metiltetrahidrofolato.
[a] Si la parte II no se corrige, realizar un tránsito con bario o un enema del intestino delgado para diagnosticar la enfermedad del íleon (p. ej., enfermedad de Crohn); partes I y II anómalas y parte III normal indica una malabsorción resultante del sobrecrecimiento bacteriano (p. ej., síndrome del asa ciega).
[b] La endoscopia del tracto gastrointestinal superior es útil también para excluir un carcinoma gástrico si se desarrolla dispepsia en una anemia perniciosa conocida.
[c] Actualmente, el análisis de la homocisteína plasmática es fácilmente accesible; en la sospecha del déficit de B_{12} constituye una prueba útil del déficit de cobalamina bioquímica. La corrección de los valores elevados tras el tratamiento confirma el déficit.

bil y la adición de ascorbato ha reducido el coeficiente de variación a la mitad en los análisis del folato sérico en las inspecciones externas de garantía de la calidad[76]. La interacción entre la B_{12} sérica, el folato sérico, el folato eritrocitario, la homocisteína plasmática y el AMM se muestra en la tabla 8.4. A la vista de las limitaciones de los análisis del folato eritrocitario y del folato sérico, resulta prudente medir ambos.

Investigación del déficit de cobalamina

Las principales causas del déficit de cobalamina se muestran en la tabla 8.5. En caso de sospecha de malabsorción, es necesaria una evaluación más amplia de la absorción intestinal de la vitamina B_{12} con la prueba de Schilling (es decir, determinación de la excreción urinaria de la vitamina B_{12} oral radiomarcada con y sin administración de factor intrínseco [FI]). La prueba de Schilling puede repetirse tras la terapia antibiótica para demostrar la corrección de la malabsorción como resultado del sobrecrecimiento bacteriano en el síndrome del asa ciega.

Investigación del déficit de folato

La falta de un método estandarizado y de un método de referencia reconocidos internacionalmente dificulta la definición de un punto de corte clínico para el déficit de folato, por encima del cual no se encuentre ninguna evidencia clínica ni bioquímica de dicho déficit. Se han hallado valores elevados de homocisteína en sujetos ancianos[25], indicativos del posible déficit subclínico, con valores de folato inferiores a los 4,8 nmol/l. Las causas del déficit clínico y la información de apoyo o las pruebas diagnósticas se muestran en la tabla 8.6.

Tabla 8.3. Lista de comprobación combinada de las características clínicas y de laboratorio para el diagnóstico de la anemia perniciosa

Lista de comprobación diagnóstica que permite el diagnóstico de anemia perniciosa en pacientes con baja B_{12} que no sean vegetarianos o posgastrectomizados	Criterios de laboratorio	Criterios clínicos
Criterios menores	Macrocitosis Anemia Homocisteína plasmática elevada pH gástrico superior a 6. Gastrina sérica elevada. Anticuerpos anticélulas parietales gástricas positivos	Parestesia, envaramiento o ataxia Hipotiroidismo Vitíligo Antecedentes familiares de anemia perniciosa o de hipotiroidismo
Criterios mayores	B_{12} sérica baja (<180 ng/l) o ácido metilmalónico sérico elevado en presencia de una función renal normal. Anemia megaloblástica no originada por un déficit de folato. Anticuerpos antifactor intrínseco positivos utilizando una prueba de alta especificidad	
Criterios de referencia estándar	La prueba de Schilling muestra malabsorción de la cianocobalamina oral corregida mediante la administración conjunta de factor intrínseco	

Limitaciones de los análisis de cobalamina y de folato para el diagnóstico del déficit de folato y de cobalamina

Dado que muchos pacientes con valores bajos de vitamina B_{12} sérica no tienen déficit de cobalamina, clínico o subclínico, demostrable, parece existir una falta de especificidad en los análisis de la cobalamina. El valor predictivo, positivo o negativo, de un resultado bajo o normal del folato o de la vitamina B_{12} séricos puede mejorarse combinando el resultado de laboratorio con una evaluación cuidadosa de otros hallazgos de laboratorio y con la evaluación clínica del paciente. Un resultado anómalo aislado del folato o de la vitamina B_{12} séricos o del folato en sangre total no debe ser el único criterio en el que se basen las decisiones de tratamiento; es necesario repetir el análisis y llevar a término otra evaluación clínica confirmadora antes de llegar a una conclusión diagnóstica. Se recomiendan pruebas adicionales, como la determinación del valor de los metabolitos y el control de la respuesta al tratamiento.

Estándares, exactitud y precisión de los análisis de folato y de cobalamina

Actualmente no existen métodos de referencia internacionalmente reconocidos para la determinación de la cobalamina sérica. Se ha propuesto la extracción en fase sólida y la ionización por electrospray seguida de la determinación en un espectrómetro de masas de la principal forma fisiológica del folato (5-MTHF) como método de referencia para el folato[26,27]; contra el valor del 5-MTHF se pueden verificar los estándares del suero o del suero de la sangre total y en el Reino Unido se ha desarrollado un estándar del folato en sangre total (v. pág. 591)[28]. La evaluación de los análisis automatizados de la fijación, ya comercializados, mediante experimentos de recuperación ha mostrado la infrarrecuperación del 5-MTHF añadido y la sobrerrecuperación del ácido pteroilglutámico (APG), mientras que los métodos de referencia propuestos muestran una recuperación cercana al 100% y una estrecha concordancia con los análisis microbiológicos adecuadamente calibrados[77]. La sensibilidad diferencial de los análisis al ácido pteroilglutámico y la variabilidad genética de los grupos formilo de los folatos *in vivo* originan la variabilidad entre métodos. El análisis microbiológico fue el método utilizado para asignar valor al Estándar Británico de la vitamina B_{12} del suero humano[29]. En la práctica, la exactitud para el folato sérico y eritrocitario y la cobalamina sérica se juzga comparando las prestaciones entre los métodos especificados según los esquemas de evaluación externa de la calidad. Éstos han mostrado unos coeficientes de variación (CV) para la vitamina B_{12} sérica intramétodo y para los análisis globales del 4-12% y de hasta 20% en valores clínicamente relevantes; hay, por tanto, un sustancial intervalo «gris» indeterminado entre los valores normales y los bajos. Los CV del folato intra e intermétodo están comprendidos entre el 8 y el 20% y CV mayores, de hasta el 50%, se observan en los análisis del folato eritrocitario. Las causas de esta variabilidad dependen de factores del propio paciente así como de factores preanalíticos, analíticos y postanalíticos, como se comentará más adelante.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 8.4. Interacción entre la cobalamina sérica, el folato sérico, el folato eritrocitario, la homocisteína plasmática, el ácido metilmalónico sérico, el ácido metilmalónico urinario y la holotranscobalamina

Estado clínico	B_{12} y folato normales	Déficit de B_{12}	Déficit de folato
B_{12} sérica[a]	Habitualmente normal, pero puede estar elevada en las hepatopatías, los trastornos mieloproliferativos, la inflamación aguda, la recuperación de una neutropenia autoinmunitaria. Baja en el 25% de los sujetos ancianos	Habitualmente baja, sin embargo, hasta el 5% de los pacientes con anemia megaloblástica pueden tener resultados dentro del intervalo de referencia	Habitualmente normal; sin embargo, la B_{12} baja puede observarse en el déficit de folato grave, que se corrige al administrar monoterapia con ácido fólico
Folato sérico[a]	Habitualmente normal	Habitualmente normal; el folato sérico elevado puede producirse en el déficit de B_{12}	Habitualmente bajo; sin embargo, se encuentran valores normales con las mejoras recientes de la dieta
Notas sobre el folato eritrocitario	Los análisis de folato pueden presentar respuestas diferentes al ácido fólico[b] en comparación con el MTHF[c]. Puede que los análisis no estén optimizados para la matriz de los hemolizados. La definición del intervalo de referencia requiere un método de referencia y estudios poblacionales		
Folato eritrocitario[a]	Habitualmente normal	Bajo	Habitualmente bajo; sin embargo, puede estar normal en los estados de déficit muy agudo
Homocisteína plasmática	Habitualmente normal, pero puede estar elevada en la insuficiencia renal o en la mutación C677T del MTHFR. Los valores pueden reducirse con los suplementos de folato	Elevada en el déficit de B_{12} y en el 50% de las muestras de pacientes con una B_{12} baja indicativa de un estado metabólico deficitario en B_{12}	Elevada en el déficit de folato; corregida con la terapia con ácido fólico
Ácido metilmalónico sérico	Habitualmente normal; elevado en el 10% de los pacientes normales, en la ingesta elevada de metionina o en la insuficiencia renal	Elevado en el déficit de B_{12} y en el 50% de las muestras de pacientes con B_{12} baja indicativa de un estado metabólico de déficit de B_{12}	Habitualmente normal; sin embargo, está elevado en el 5% de los pacientes con déficit de folato
Ácido metilmalónico urinario	Normal incluso en la insuficiencia renal	Elevado	Normal
Holotranscobalamina	Normal, aunque hay valores inferiores en los ancianos	Baja en el déficit de B_{12}	Normal

[a] Para los valores de referencia normales, véase el capítulo 2, página 14.
[b] Ácido pteroilglutámico.
[c] Metiltetrahidrofolato.

Factores genéticos

Se han descrito diversos polimorfismos de la metilenetetrahidrofolato reductasa[30] que alteran la proporción del formilfolato en el suero, que pueden ser una fuente potencial de las respuestas diferenciales de un suero a los distintos análisis. Los individuos homocigotos para el polimorfismo genético C677T tienen unos valores de homocisteína plasmática un 25% más elevados que los controles[31]. Se observa un efecto interactivo genético-nutriente consistente en que el polimorfismo confiere un mayor efecto sobre los valores de la homocisteína en los individuos con bajos niveles de folato. Los valores de homocisteína se ven afectados por el tabaquismo, la edad, las neuropatías y fármacos como la levodopa y los suplementos de folato.

Preparación preanalítica de la muestra

La vitamina B_{12} sérica es estable a temperatura ambiente y no se ve afectada por el manejo de la muestra a menos que haya una hemólisis de la misma. El folato se afecta por la ingesta dietética reciente por lo que, de ser posible, se han de tomar las muestras en ayunas. Sin embargo, esto es difícil en la práctica y se asume que el intervalo de referencia está también basado en muestras en ayunas. Se observa una pérdida notable de la actividad del folato como resultado de la inestabilidad ante la luz y la temperatura. Dado que los hematíes contienen de 30 a 50 veces más ácido fólico que el suero, incluso una hemólisis ligera afectará al análisis del folato sérico. Así, el transporte y la separación rápidos anteriores al análisis, el evitar el almacenamiento a temperatura ambiente y el almacenamiento de las muestras a 2-8°C

Tabla 8.5. Causas del déficit de cobalamina

Ingesta reducida	**Información diagnóstica de apoyo**
Vegetariano estricto Modas dietéticas que excluyen los productos lácteos y la carne Niños alimentados al pecho de madres vegetarianas o con déficit de cobalamina Ingesta dietética escasa en los ancianos	Antecedentes dietéticos Origen étnico/cultura
Malabsorción como resultado de pérdida o de inactividad del factor intrínseco	**Pruebas diagnósticas/información de soporte**
Anemia perniciosa addisoniana	Criterios diagnósticos de la anemia perniciosa (v. tabla 8.3)
Gastrectomía (parcial o total)	Antecedentes de cirugía gástrica
Sobrecrecimiento bacteriano o infestación parasitaria del intestino delgado	Prueba del aliento con lactosa radiomarcada para el sobrecrecimiento bacteriano Repetición de la prueba de Schilling tras la terapia antibiótica
Disfunción pancreática con fallo de la tripsina para liberar la B_{12} de las proteínas fijadoras R	Pruebas de función pancreática; la disfunción del páncreas exocrino produce una falsa positividad de la parte I de la prueba de Schilling
Malabsorción como resultado del fallo de la captación del complejo B_{12}-factor intrínseco en la resección ileal	Estudio radiológico, enteroscópico o con la cámara en cápsula del intestino delgado para la enfermedad de Crohn del íleon terminal, ileítis tuberculosa
Síndrome congénito de Imerslund-Gräsbeck	Sujetos de origen escandinavo
Esprúe tropical	Biopsia del intestino delgado
Síndrome de Zollinger-Ellison	Úlceras gástricas y duodenales múltiples Imagen de adenoma pancreático
Malabsorción de la cobalamina alimentaria	**Pruebas/información diagnóstica de apoyo**
Gastritis atrófica con aclorhidria Cirugía gástrica	Hallazgos endoscópicos y por biopsia gástrica
Proteínas de transporte anómalas	**Pruebas diagnósticas/información de apoyo**
Déficit de la transcobalamina II	Anemia megaloblástica en presencia de valores normales de cobalamina; valores de transcobalamina II
Resultados del déficit de transcobalamina I	Sin evidencia de déficit clínico pero con valores bajos de cobalamina sérica Posible caída de los valores de la holotranscobalamina en los ancianos
Errores congénitos del metabolismo de la cobalamina	**Pruebas diagnósticas/información de apoyo**
	Determinación del ácido metilmalónico urinario y sérico y de los metabolitos
Efectos farmacológicos adquiridos	**Información de apoyo**
Óxido nitroso: exposición crónica repetida Colchicina: la utilización crónica altera la ingesta de B_{12} como resultado de la diarrea	Antecedentes farmacológicos

durante un máximo de 48 h, o a –20 °C durante no más de 28 días, son factores críticos para la exactitud y la precisión de los análisis del folato sérico. La presencia de lisis en una muestra de plasma o de suero puede determinarse rápidamente y cuantificarse (v. pág. 163).

La adición de ácido ascórbico o de ascorbato sódico (5 mg/ml) estabilizará el folato en el suero o en los hemolizados, lo que permitirá ampliar los tiempos de almacenamiento de la muestra. La estabilización del folato sérico con ascorbato sódico, añadido al tubo de recogida de sangre original, mejoraría la reproducibilidad de los análisis del folato sérico de rutina como se muestra en las investigaciones externas del control de calidad[76,77], pero requeriría la utilización de tubos de muestra separados para la vi-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 8.6. Causas del déficit de folato	
Ingesta reducida	**Pruebas diagnósticas/información de apoyo**
Dieta pobre sobre todo en alcohólicos (de vino y de licores porque la cerveza contiene folato) «Dieta de té y tostadas» en estudiantes o ancianos Modas dietéticas Niños prematuros Nutrición parenteral sin suplementos	Antecedentes dietéticos y alcohólicos
Malabsorción	**Pruebas diagnósticas/información de apoyo**
Enfermedad celíaca (a menudo coexistente con el déficit de hierro) Esprúe tropical Resección intestinal, síndromes de malabsorción	Anticuerpos antigliadina, antiendomisio y antitransglutaminasa tisular Biopsia del intestino delgado
Efectos farmacológicos	**Pruebas diagnósticas/información de apoyo**
Sulfasalazina, metotrexato, trimetoprima-sulfametoxazol, pirimetamina, fenitoína, valproato sódico, anticonceptivos orales	Antecedentes farmacológicos Aspiración de la médula ósea
Hiperhomocisteinemia hereditaria	
Los homocigotos del C677T MTHFR tienen niveles menores de folato	
Producción aumentada de folato	
Embarazo: caída progresiva en el tercer trimestre Aumento de las necesidades por lactancia Alteraciones cutáneas: psoriasis grave o exfoliación Hemodiálisis Hemólisis: hemoglobinopatía, hemoglobinuria paroxística nocturna, anemia hemolítica autoinmunitaria (v. caps. 11 y 12).	

tamina B_{12} y el folato, ya que el ascorbato interfiere con los análisis de la cobalamina. El plasma con EDTA no es adecuado y el plasma heparinizado puede producir valores más elevados. Las muestras deben estar libres de fibrina y de burbujas.

Factores analíticos

La sensibilidad analítica varía entre los diversos métodos: la detección de unos valores de vitamina B_{12} sérica de 50 ng/l o inferiores es preferible a los límites inferiores para la detección de 150 ng/l, porque nos proporciona un aumento de la sensibilidad en el, clínicamente importante, extremo inferior del intervalo de referencia. La sensibilidad analítica en los análisis de quimioluminiscencia se define como la concentración de analito que corresponde a las unidades de luz relativas inferiores a dos desviaciones estándar de la media de las unidades de luz relativas de 20 réplicas del estándar cero del analito. En muchos análisis del folato ésta se sitúa en la región de 0,3 ng/ml (0,68 nmol/l) o por debajo.

Limitaciones e interferencias

El ácido ascórbico destruye la vitamina B_{12}; por tanto, el suero tratado con ascorbato no puede utilizarse para los análisis de la B_{12}. El metotrexato y el ácido folínico interfieren con la determinación del folato porque estos fármacos reaccionan de forma cruzada con las proteínas que fijan el folato. Una hemólisis poco intensa aumenta significativamente los valores de folato sérico como resultado de los valores elevados de folato eritrocitario. La lipidemia con triglicéridos >2,25 mmol/l (2 g/l) y bilirrubina >340 µmol/l (200 mg/l) puede afectar a los análisis.

Postanalítica

La interpretación clínica de los datos de laboratorio debe tener en cuenta el valor predictivo, positivo o negativo, de un resultado. El informe ha de incluir un rango de referencia indicando su procedencia. El suplemento nutricional con folato o la ingesta adicional de vitaminas por la población ha originado distribuciones bimodales de los valores de la vitamina, complicando aún más la definición de normalidad.

MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LA COBALAMINA Y DEL FOLATO

Los análisis microbiológicos, los bioanálisis y los análisis por dilución de radioisótopos para la vitamina B_{12} y el folato del suero[32] todavía se utilizan, aun cuando su uso está restringido a una minoría cada vez más reducida de laboratorios; sin embargo, son una parte importante de la eva-

luación tanto de los nuevos métodos automatizados como de los nuevos estándares internacionales. Están descritos en la novena edición de este libro.

Los métodos actuales son los análisis de separación en fase sólida, heterogéneos y altamente automatizados, con sistemas de detección por quimioluminiscencia o fluorescencia.

ANÁLISIS DE LA FIJACIÓN COMPETITIVA A PROTEÍNAS

Principios generales

La mayoría de los analizadores de acceso aleatorio, multianalito y de plataforma única automatizada realizan análisis para la vitamina B_{12}, el folato y la homocisteína séricas por fijación competitiva no isotópica a las proteínas o por inmunoanálisis. Como parte de los procedimientos de separación se pueden utilizar segundos anticuerpos. Estos análisis se han diseñado para análisis en suero, y es posible que las plataformas del análisis no estén optimizadas para el análisis de los hemolizados.

ANÁLISIS DE LA VITAMINA B_{12} SÉRICA

Liberación de los fijadores endógenos y conversión del analito a la forma apropiada

Cerca del 99% de la vitamina B_{12} sérica está unida a las proteínas de fijación endógenas (transcobalaminas) y debe liberarse de ellas antes de su determinación. El paso de la liberación utiliza la hidrólisis alcalina (NaOH a pH 12-13) en presencia de cianuro potásico (KCN), que convierte la cobalamina en formas más estables: la cianocobalamina y el ditiotreitol (DTT). Con esta transformación se evita que la vitamina B_{12} liberada se vuelva a unir a las transcobalaminas. La hidrólisis alcalina precisa un ajuste posterior del pH para alcanzar el estado óptimo para el agente fijador.

Unión de la vitamina B_{12} al *kit* de fijación

La unión de la vitamina B_{12} al *kit* de fijación es el paso competitivo del análisis en el que la cianocobalamina obtenida del suero compite con la cobalamina marcada, que normalmente forma un complejo con un sustrato quimioluminiscente o fluorescente o con una enzima a través de sitios de unión limitados sobre el factor intrínseco porcino. La especificidad de la cobalamina está garantizada por la depuración del FI o por el bloqueo de los fijadores corrinoides contaminantes (fijadores R) mediante la adición de un excedente de cobinamida bloqueante. La especificidad del FI puro y bloqueado puede demostrarse añadiendo cobinamida al suero. No debería aumentar el valor del análisis. El FI recombinante puede ofrecer una mayor especificidad sobre el FI porcino químicamente purificado. Otros análisis se basan en un paso de desnaturalización alcalina para inactivar los fijadores endógenos. Los análisis no deben sufrir la influencia de la presencia de títulos elevados del anticuerpo antifactor intrínseco presente en el suero de los pacientes.

Separación de la vitamina B_{12} unida y no unida

Tras la fijación competitiva, la separación de la vitamina B_{12} unida y no unida se consigue con diversos métodos electro o fisicoquímicos e inmunológicos. El analizador *Roche Elecsys* utiliza una célula de determinación de la electroquimioluminiscencia en la que los complejos B_{12} unida-rutenio FI, fijados por la biotina-estreptavidina a micropartículas paramagnéticas, son inmovilizados temporalmente en un electrodo por un imán. El analizador *Abbott IMx* utiliza micropartículas de polímero (cuentas) revestidas con FI porcino para unir la vitamina B_{12}, y la vitamina B_{12} unida es posteriormente inmovilizada por fijación irreversible a una matriz de fibra de vidrio. Estos métodos están diseñados para mejorar la separación de la vitamina B_{12} unida y no unida; pueden utilizar conjugados murinos de enzima-anticuerpo antifactor intrínseco como parte de la generación de la señal.

Generación de la señal

La fracción unida se detecta por adición de sustratos quimioluminiscentes, fluorescentes o enzimáticos colorimétricos, que producen la generación de fluorescencia o la emisión de luz. Hay dos tipos de señal: *flash*, inducida eléctricamente o por el pH, y de meseta, que es continua. La tasa inicial de reacción o el área bajo la curva se utilizan para calcular el resultado.

Inmunoanálisis por electroquimioluminiscencia

En *Roche Elecsys* y *E170* se aplica un voltaje al electrodo en el que se han inmovilizado por atracción magnética los complejos B_{12} unida-rutenio FI y se genera una luminiscencia electroquímica, que se mide con un fotomultiplicador; las unidades de luz relativa son inversamente proporcionales a la concentración de B_{12} en la muestra. La señal producida es cronometrada e integrada por el *software* del instrumento.

Generación de fluorescencia de las enzimas fijadas

En el *Abbott Axsym* se disocian sustratos como el 4-metilumbeliferil fosfato debido a la acción de una enzima (es decir, el complejo fosfatasa alcalina-ligando) y la reacción resultante genera fluorescencia, cuya intensidad es inversamente proporcional a la concentración de la vitamina B_{12} en la muestra.

Los analizadores *Bayer Centaur, ACS* y *Abbott Architect* utilizan ésteres de acridinio unidos al complejo B_{12}-FI acoplados a partículas paramagnéticas; se emiten fotones en respuesta al cambio de pH. El aparato de *Diagnostic Products Immulite 2000* utiliza adamantil dioxetano fosfato

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

como sustrato alternativo, que se disocia mediante el complejo B_{12}-FI marcado con fosfatasa alcalina, dando como resultado la generación de una señal quimioluminiscente en meseta. Aunque el analizador *Bayer immuno 1* utiliza complejos marcados con fosfatasa alcalina, el sustrato es p-nitrofenil fosfato y la generación de la señal a 405 nm es estrictamente una reacción de formación de color. El analizador *Tosoh Eurogenetics* utiliza fosfatasa alcalina/4-metilumbeliferil fosfato y el *Beckman Coulter Access* usa la fosfatasa alcalina/dioxetano fosfato (Lumi-Phos) para la generación de la señal.

Las descripciones precisas de los métodos de análisis se dan en la información del producto.

MÉTODOS PARA EL FOLATO SÉRICO

Los primeros métodos utilizados para la determinación de folato sérico fueron los análisis microbiológicos. Posteriormente se desarrollaron los análisis de dilución de radioisótopos (RID, del inglés *radioisotope dilution*), y los nuevos análisis de fijación competitiva automatizados y comercialmente disponibles están basados en principios similares. Igual que ocurre en el caso de la vitamina B_{12}, ha disminuido la utilización de los procedimientos originales microbiológicos y de RID para las mediciones del folato sérico y del eritrocitario. La definición de la respuesta del análisis a las diferentes formas del folato es crucial para las comparaciones interanalíticas, sobre todo a la vista del efecto de los suplementos dietéticos de folato.

Liberación de los fijadores endógenos

El folato sérico, presente como 5-MTHF, se libera de los fijadores endógenos (2/3 unidos débilmente a las proteínas del suero y una minoría a los receptores del folato solubles derivados de la membrana) por desnaturalización alcalina. En la mayoría de los análisis de folato se utiliza DTT o monotioglicerol (MTG) para impedir que éste se vuelva a unir a los fijadores endógenos y para mantener el folato en su forma reducida.

Unión del folato a la proteína fijadora del folato

La β-lactoglobulina, aislada de la leche de vaca, se utiliza habitualmente como agente fijador en los análisis del folato, es decir, como proteína fijadora del folato (PFF). Desgraciadamente, estas lactoglobulinas no son específicas para la fijación del 5-MTHF y fijarán muchas formas de folato dependiendo del pH. Estas propiedades se han utilizado para la estandarización de los análisis de folato. La forma fisiológicamente activa (5-MTHF) es muy inestable. El ácido pteroilglutámico (APG), presente en los suplementos vitamínicos, es más estable, se fija a la PFF y se ha utilizado como un estándar alternativo para los análisis de folato. Su utilización como estándar se basa en la observación de que las afinidades de fijación del 5-MTHF y del APG son equivalentes a un pH de 9,3 ± 0,1. Es por tanto esencial que el pH se mantenga de forma estricta durante la fase de unión del procedimiento[33]. En la mayoría de estos análisis, el folato obtenido del suero compite con el quimioluminiscente o con el folato marcado con enzimas por la ocupación de los sitios limitados en la PFF. En los métodos de *Roche* la PFF está marcada con rutenio y se produce una competición entre el folato endógeno y el marcado con biotina.

Separación del folato unido y no unido

Tras la fijación competitiva, la separación del folato unido y no unido se consigue con diversos métodos electro o fisicoquímicos e inmunológicos.

En el análisis de captura de iones de *Abbott Imx,* la inmunoglobulina G (IgG) anti-PFF murina produce complejos polianión-folato cargados negativamente. Se capturan de forma electrostática utilizando una matriz de fibra de vidrio cargada positivamente (carga impartida por un compuesto de amonio cuaternario de alto peso molecular) que elimina la fracción unida. El analizador *Beckman Access* utiliza partículas paramagnéticas recubiertas con IgG de cabra antirratón/anti-PFF murina. *Diagnostic Products* utiliza cuentas de poliestireno recubiertas con anti-PFF murina con separación por centrifugación.

Generación de la señal

La emisión de electroquimioluminiscencia, de quimioluminiscencia, de fluorescencia o la emisión de luz son similares a los métodos descritos para la vitamina B_{12}. En los análisis donde el complejo fijado a la vitamina B_{12} está marcado con ésteres quimioluminiscentes, la señal se genera en respuesta a un cambio en el pH o es inducido eléctricamente.

MÉTODOS PARA EL FOLATO ERITROCITARIO

Mientras que el *Lactobacillus casei* responde de la misma forma a los triglutamatos que a los monoglutamatos, la afinidad de la PFF varía con el número de residuos de glutamato. Los análisis reproducibles de fijación de la proteína para el folato eritrocitario sólo pueden conseguirse mediante la liberación y conversión de los poliglutamatos del folato unido a la proteína, principalmente el 5-MTHF con cuatro o cinco residuos de glutamato adicionales, a una forma de monoglutamato. La dilución adecuada de los hematíes en una solución hipotónica, un pH entre 3,0-6,0 (idealmente, pH 4,5-5,2), para crear unas condiciones óptimas para la folato desconjugasa plasmática (poliglutamato hidrolasa), y el ácido ascórbico son necesarios para estabilizar las formas reducidas[34,35].

Las formas de preparar los hemolizados para los nuevos soportes de análisis varían ampliamente. La concentración de ácido ascórbico oscila entre el 0,09 y el 1%, los factores de dilución entre 1:5 y 1:31 y la duración de la preparación de hemolizado entre 40 y 180 min. Algunos análi-

sis requieren la adición de proteína y utilizan la albúmina de suero bovino o la de suero humano, mientras que otros son únicamente acuosos. El pH del diluyente para lisar varía de 3,0 a 4,0 y el del paso de la desconjugasa de 4,0 a 6,8 (el pH final del lisado tras la adición de la proteína varía de 4,4 a 7,5). Estos factores pueden explicar en parte las grandes diferencias intermétodo detectadas en los estudios para la evaluación externa de la calidad. La lisis y la desconjugación inadecuadas darán resultados falsamente bajos[36,37].

Si el fabricante no da recomendaciones de uso, se puede utilizar el método descrito más abajo, que es adecuado para preparar hemolizados. Sin embargo, cuando se analiza el hemolizado utilizando la metodología del folato sérico, este método de preparación puede no ser adecuado para todos los instrumentos.

Preparación del hemolizado

Las muestras de folato eritrocitario se recogen habitualmente en tubos con EDTA y pueden conservarse a 4 °C hasta 48 h antes de la preparación del lisado. El lisado se prepara añadiendo 0,1 ml de sangre total con un Hto conocido a 1,9 ml de ácido ascórbico acuoso recién preparado,1 g/dl, e incubando a continuación la muestra a temperatura ambiente durante 60 min en la oscuridad. El ácido ascórbico estabiliza el folato y el pH de 4,6 permite a la folato desconjugasa del plasma desconjugar las formas poliglutamato a la forma monoglutamato. La actividad del folato debe ser analizada inmediatamente, o guardarse el lisado a 4 °C durante no más de 24 h antes del análisis. Es posible el almacenamiento a –20 °C durante períodos más largos, pero se observa una reducción de aproximadamente un 10% en la actividad tras un ciclo de congelación/descongelación. La sangre total con heparina, EDTA o citrato-fosfato-dextrosa (CPD) puede utilizarse en algunos, pero no en todos, los sistemas de análisis.

Cálculo del folato eritrocitario a partir de los resultados de folato del hemolizado

1. Multiplicar el valor del folato del hemolizado por el factor de dilución (p. ej., 21 si es una dilución 1:21) para obtener la concentración de folato en sangre total en µg/l.
2. Dividir el resultado de folato en sangre total en (l) por el Hto (l/l) y multiplicar por 100.
3. El resultado obtenido en (2) debe, si es posible, corregirse según el valor del folato sérico, el cual, en poblaciones de pacientes que toman folato dietético suplementario, puede ser actualmente bastante significativo, como se ilustra en el siguiente ejemplo de cálculo:

$$\text{Folato eritocitario corregido µg/l} = \text{folato eritrocitario µg/l} - \text{folato sérico µg/l} \times \frac{(1\text{-PCV})}{\text{PCV}}$$

Por ejemplo, cuando el Hto es 0,45, el folato eritrocitario es 180 µg/l y el folato sérico es 28 µg/l, entonces:

$$\text{Folato eritrocitario corregido (µg/l)} = 180 \text{ µg/l} - 28 \text{ µg/l} \times \frac{(1 - 0{,}45)}{0{,}45} = 145{,}8 \text{ µg/l}$$

Muchos análisis en suero tienen un límite superior de 22-28 µg/l y, por tanto, la muestra debe ser siempre diluida y reanalizada para obtener resultados exactos. El folato sérico se expresa tradicionalmente en µg/l o en ng/ml; para convertirlo a unidades del SI: µg/l × 2,265 = nmol/l y nmol/l × 0,44 = µg/l.

Calibración de los análisis de la vitamina B_{12} y del folato séricos y del folato eritrocitario

En los métodos para la determinación de la vitamina B_{12} sérica, la cobalamina está fijada a la proteína y, por tanto, los estándares necesitan ser suero liofilizado o una solución acuosa de cianocobalamina. Se dispone de liofilizados en el National Institute for Biological Standards and Control (v. pág. 591). Para los análisis del folato sérico, el 5-MTHF, es decir, la forma fisiológicamente activa del folato, debe utilizarse como estándar. Sin embargo, el 5-MTHF es altamente inestable y el APG se ha utilizado, históricamente, como el calibrador primario, ya sea por adición gravimétrica a los estándares acuosos o para asignar valores a los estándares de matriz sérica secundarios. El principio subyacente al uso del APG se basa en la unión equimolar del 5-MTHF o del APG a pH 9,3[37]. Un trabajo más reciente sugiere que el pH de la unión equimolar debe estar más cercano a los 8,9 que a los 9,3. Los estándares pueden ser acuosos o bien estar en una matriz de proteína humana.

Estándares de folato en sangre total

Se dispone de una preparación de referencia internacional para los folatos en sangre total[28], obtenible en el National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) (v. pág. 591).

Calibración del instrumento primario

Actualmente, hay un fabricante que ha elegido el 5-MTHF como calibrador de instrumento, aunque está referenciado a los estándares primarios gravimétricos acuosos. Los métodos calibrados de esta forma deben optimizarse para la detección del 5-MTHF y no deberían necesitar el ajuste del pH de unión a 9,3. La mayoría de los demás fabricantes utilizan calibradores de APG gravimétricos o valores de APG asignados a los calibradores de matriz sérica referenciados respecto a métodos de inmunodifusión radial (RID) antiguos.

Calibración por ajuste interno

La mayoría de los sistemas de análisis automatizados utilizan curvas de calibración almacenadas en sistemas de códigos de barras en 2D con cada lote de reactivo. El código de barras contiene también las fórmulas matemáticas para cambiar o ajustar las respuestas observadas a la curva

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

maestra cuando el instrumento requiere una calibración de rutina. El intervalo de calibración en los lotes de reactivos varía habitualmente de 7 a 28 días: la estabilidad varía hasta los 28 días. La mayoría de los instrumentos requieren una calibración en 2 puntos cuando cambian los números de lotes de los paquetes de los reactivos primarios, cuando se reemplazan los componentes del sistema y cuando los resultados internos del control de calidad están fuera del intervalo. Hay que desechar los reactivos cuando se llega al final de los intervalos de estabilidad y no deben utilizarse con posterioridad a las fechas de caducidad. Se debe tener un cuidado especial para asegurar que los calibradores están correctamente mezclados y homogeneizados. Las alícuotas de reactivos pueden almacenarse a 2-8 °C o a –20 °C si lo permite el fabricante.

Control de calidad interno

Como requisito mínimo, hay que analizar diariamente dos niveles del material del control de calidad al analizar las muestras. Es posible que el técnico prefiera elegir un lote de análisis o acceder a los controles de forma realmente aleatoria aunque, a la vista de la inestabilidad del folato, se deben evitar los tiempos de ensayo prolongados para tener en cuenta el repertorio de pruebas que deben realizarse en un conjunto determinado de muestras. Existen controles comerciales adecuados[b].

PRUEBAS PARA LOS METABOLITOS ORIGINADOS EN LAS RUTAS METABÓLICAS DE LA COBALAMINA Y DEL FOLATO

Hace tiempo que se ha postulado la determinación de los metabolitos que se acumulan en ausencia de cobalamina o de folato como un índice más sensible del déficit de cobalamina o de folato que los propios valores totales de cobalamina o de folato[11]. La deficiencia de cobalamina produce la falta de conversión de metilmalonil-coenzima A (CoA) en succinil-CoA por la metilmalonil-CoA mutasa, produciendo la acumulación de metilmalonil-CoA y el producto de su hidrólisis AMM, que se incrementa tanto en suero como en orina. La cobalamina es también un cofactor de la acción de la metionina sintetasa, que convierte la homocisteína en metionina. El 5-MTHF está también implicado en la síntesis de la metionina por metilación de la cobalamina. Los valores bajos de cobalamina o de folato originan, por tanto, un aumento de la homocisteína y del AMM en el plasma y en la orina.

Un estudio[38] de muestras de pacientes con valores de vitamina B_{12} sérica inferiores a 170 ng/l mostró un AMM aumentado en el 40% de los casos y una homocisteína elevada en el 54% de éstos. Esto sugiere que los valores bajos de vitamina B_{12} tienen únicamente una especificidad del 40-54% para el estado de deficiencia de cobalamina, aunque el déficit concomitante de folato puede haber producido valores bajos de cobalamina. Si estos pacientes tuvieran un déficit tisular real de vitamina B_{12}, sería de esperar que los valores elevados de los metabolitos se redujeran a un nivel normal con el tratamiento. Esto es lo que sucedió en aquellos pacientes con un AMM elevado, lo que sugiere que el AMM elevado tiene una especificidad cercana al 100%. para el déficit de vitamina B_{12} en este grupo preseleccionado. La hiperhomocisteinemia no se corrigió en aproximadamente la mitad de los pacientes con valores elevados, lo que indica una menor especificidad.

[b] Bio-Rad Laboratories.

DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO METILMALÓNICO

Principio

El ácido metilmalónico (AMM) es uno de los diversos ácidos dicarboxílicos presentes en la orina y en el plasma. Antes de separar el AMM de otras sustancias que interfieran es necesario obtener los derivados de estos componentes. La concentración urinaria de AMM es mayor que la concentración plasmática y necesita ser normalizada de acuerdo con la concentración de creatinina en orina y corregida según los efectos de la alteración renal o de la deshidratación.

La determinación en suero es más cómoda, no se ve afectada por la dieta y se puede utilizar la misma muestra que la obtenida para la vitamina B_{12}.

Métodos

El AMM plasmático o sérico se extrae, se purifica y se mide con el EM-CG, utilizando el derivado del AMM, *tert*-butildimetilsilil. Como estándar interno se utiliza un isótopo estable deuterado del AMM. Rasmussen[39] describió el uso del diciclohexil, otro derivado del AMM.

Hoffman[40] describió un método para detectar los errores innatos del metabolismo utilizando 0-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil) hidroxilamina HCl para obtener oxoácidos, seguido de cromatografía de partición líquida. Con la HPLC o los métodos de electroforesis capilar[41,42] más actuales, el AMM puede derivatizarse utilizando el compuesto fluorescente 1-pirenildiazometano para obtener un aducto monoéster fluorescente. Tras la separación por HPLC o por electroforesis capilar, los ácidos dicarboxílicos de cadena corta se cuantifican tras la activación de la fluorescencia inducida por láser.

Los intervalos de referencia para el AMM sérico medido por EM-CG y utilizando la media ± 3 DE del log de los datos transformados son 53-376 nmol/l (Allen[43]) y 50–440 nmol/l (Rasmussen y cols.[44]).

DETERMINACIÓN DE LA HOMOCISTEÍNA

Principio

La homocisteína es un aminoácido disulfuro presente en bajas concentraciones en las células (<1 µmol/l) y en el

plasma (a 5-15 μmol/l)[45]. La homocisteína tiene un grupo sulfhidrilo reactivo que forma puentes disulfuro con la homocisteína, con la cisteína o con grupos sulfhidrilo proteicos para generar la forma oxidada de la homocisteína: homocistina, disulfuro mixto de homocisteína-cisteína u homocisteína unida a la proteína. La homocisteína libre es menos del 2% de la homocisteína plasmática y el 80% se encuentra como homocisteína unida a la proteína; el resto es homocistina o disulfuros mixtos. Los ambientes reductores convierten todas estas sustancias en homocisteína mediante la reducción de los disulfuros, y a continuación se mide la homocisteína total.

Para su cuantificación, la homocisteína plasmática requiere la precipitación de la proteína y la reducción de los puentes disulfuro. El grupo S-H de la homocisteína se derivatiza utilizando un reactivo específico del tiol, con lo cual se detecta el aducto resultante. Se han desarrollado diferentes métodos[46] a partir de los analizadores de aminoácidos por intercambio de iones, la determinación radioenzimática, la cromatografía gaseosa capilar[47], la dilución del isótopo estable combinada con la EM-CG capilar[48], el electrospray de la cromatografía líquida seguido de la espectrometría de masas[49] y los métodos de HPLC que utilizan la detección de los fluorocromóforos. La disponibilidad creciente de la EM-CG de sobremesa puede permitir una aplicación mayor del método de dilución del isótopo estable.

Drew Scientific y *Bio-Rad* disponen actualmente de *kits* de HPLC que utilizan sistemas de detección de fluorocromóforos. Tras la adición del estándar interno estos métodos reducen en primer lugar los puentes disulfuro, y a continuación se produce la eliminación de la proteína y la derivatización de los grupos tiol. La separación requiere una HPLC en fase inversa utilizando una columna C18-DB y una fase móvil ácido heptano sulfónico/metanol a pH 1,9-2,0. La detección es por fluorescencia del fluoróforo a λ_{ex} 385 nm y λ_{em} 515 nm.

El desarrollo de los inmunoanálisis enzimáticos para la homocisteína ha cambiado de forma radical la posibilidad de dosificarla en los laboratorios de rutina. Se analizan más adelante en la siguiente sección.

Inmunoanálisis para la determinación de la homocisteína

Actualmente, diversos fabricantes han desarrollado inmunoanálisis enzimáticos automatizados[50]. El DTT tamponado libera la homocisteína unida y reduce la homocistina y los disulfuros mixtos a homocisteína. La conversión enzimática de la homocisteína en s-adenosil homocisteína (sAH) se consigue mediante la adición de adenosina y de s-adenosil hidrolasa. En los métodos de *Axis-Shield, Bayer Centaur* y *Diagnostic Products Immulite 2000*, la sAH obtenida sintéticamente se une al sistema separador (pocillos recubiertos, partículas paramagnéticas o cuentas de poliestireno). Se añade anti-sAH murina marcada que, en presencia de la sAH obtenida de la muestra, compite para unirse a la sAH inmovilizada. La concentración de anti-sAH marcada unida a la sAH en la fase de separación es inversamente proporcional a la concentración de sAH obtenida de la muestra original. Un sustrato apropiado y unas condiciones adecuadas para la generación del color, la quimioluminiscencia o la fluorescencia permiten la cuantificación del analito. El inmunoanálisis enzimático produce resultados comparables a los métodos de la EM-GC y a algunos de la HPLC[51-53].

Determinación de la homocisteína por HPLC

La HPLC de *Drew Scientific* reduce la homocisteína con 2-mercaptoetilamina y utiliza una columna C18-DB en fase inversa, con ácido heptano sulfónico/metanol en la fase móvil, para producir un derivado del amonio fluoro-benzofurazano-4-sulfonato, medido por fluorescencia. La precisión actual en las investigaciones de la UKNEQAS es del 17% para la HPLC y del 5% para el inmunoanálisis de polarización de la fluorescencia (información no publicada de la UKNEQAS Coagulation, cortesía de E. Preston & T. Woods).

Variables preanalíticas en las pruebas de la homocisteína

La homocisteína plasmática se eleva tanto en el déficit de folato como en el de B_{12}, así como en individuos con un polimorfismo genético común de la metilenetetrahidrofolato reductasa, el polimorfismo C677T, cuya forma homocigota está presente en el 10% de las poblaciones occidentales y origina unos valores de homocisteína un 25% por encima del límite superior de normalidad. El aumento de homocisteína es un factor de riesgo independiente de la enfermedad vascular, incluyendo el infarto de miocardio y el ictus[7]. Los valores de homocisteína están influenciados por la edad, la nefropatía, el tabaquismo, el consumo excesivo de café y determinados fármacos, entre los que se encuentra la levodopa. La corrección de los valores elevados de homocisteína en pacientes con déficit de cobalamina o de folato mediante la administración de una o de ambas vitaminas constituye la prueba del estado de déficit, que puede ser subclínico.

Los factores que afectan a los valores de la albúmina alterarán la homocisteína porque se une a la proteína, y la extracción de sangre no debería realizarse tras la estasis venosa o tras el descanso del sujeto en posición supina. Es preferible utilizar plasma porque las células liberan homocisteína, lo que origina un aumento del 10% durante la formación del coágulo en las muestras sin coagular. Incluso el plasma mostrará un incremento de un 10% por hora a temperatura ambiente debido a la fuga desde los hematíes[54]. Las muestras deben conservarse en hielo y centrifugarse tan pronto como sea posible, al menos antes de 1 h.

Prueba dinámica del metabolismo del folato y la cobalamina

La determinación de la respuesta del metabolito a la semana de recibir tratamiento con cobalamina o con folato proporciona la oportunidad de realizar una prueba de función

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

dinámica *in vivo* de las rutas metabólicas del folato y la cobalamina y confirmar el diagnóstico de déficit tisular de una u otra vitamina.

Otra prueba funcional dinámica del metabolismo folato-cobalamina, utilizada principalmente en los laboratorios de investigación, es la prueba de supresión de la desoxiuridina[55], en la que el fallo de la supresión, por parte de la desoxiuridina, de la incorporación de la timidina tritiada[3] H-TdR al ADN en el déficit de cobalamina o de folato se corrige mediante el tratamiento con el hematínico apropiado. El método se describe en la novena edición de este libro.

Investigación de la causa del déficit de cobalamina

Una vez confirmado el déficit de cobalamina mediante el hallazgo de un resultado de vitamina B_{12} sérica inequívocamente bajo (con o sin valores confirmatorios elevados de los metabolitos y respuesta a la terapia), la etiología de la cobalamina baja debe ser dilucidada como se indica en la tabla 8.5. Los anticuerpos anticélulas parietales gástricas se encuentran en el 90% de los pacientes con anemia perniciosa, aunque su especificidad es baja, encontrándose en el 15% de los sujetos ancianos, por lo que su valor discriminatorio es escaso. La aclorhidria como causa de la malabsorción de la cobalamina debe sospecharse por la presencia de valores de gastrina elevados[56].

DETERMINACIÓN DEL ANTICUERPO ANTIFACTOR INTRÍNSECO

Principio

Se han detectado dos tipos de anticuerpos anti-FI en el suero de los pacientes con anemia perniciosa. El tipo I bloquea la unión de la vitamina B_{12} al factor intrínseco (FI), mientras que el tipo II impide la fijación del FI o del complejo FI-B_{12} a los receptores ileales. Los anticuerpos del tipo II (anticuerpos precipitantes) pueden ser precipitados por el complejo FI-B_{12} y sulfato de sodio a pH 8,3 en tampón barbital. Se ha notificado que más del 60% de los pacientes con anemia perniciosa tienen anticuerpos del tipo I o II[57,58]. Actualmente, disponemos de análisis por unión competitiva que han reemplazado ampliamente a los análisis por dilución de radioisótopos. Diversos fabricantes están desarrollando análisis con anticuerpos anti-FI para sus plataformas de inmunoanálisis multianalito.

Se han revisado los métodos de análisis[57] y en la novena edición de este libro se describe un método para la detección de los anticuerpos anti-FI, tipos I y II, basado en la fijación competitiva por dilución de radioisótopos.

Equipos para la determinación de anticuerpos antifactor intrínseco

Los equipos de análisis por fijación competitiva radioisotópica que detectan los anticuerpos bloqueadores (tipo I) están siendo reemplazados por análisis de unión competitiva automatizados que permiten incluirlos en el repertorio de pruebas de estas plataformas multianalito. Diversas compañías disponen de un ELISA (análisis de inmunoabsorción ligada a enzimas) que detecta los anticuerpos del tipo I y II.

Principios del análisis de la unión de los anticuerpos antifactor intrínseco tipo I

Los métodos actuales para los anticuerpos séricos antifactor intrínseco tipo I (AcFI) son adaptaciones del análisis de la fijación competitiva de la vitamina B_{12}.

El suero del paciente se incuba con un fijador, como la celulosa microcristalina, recubierta con FI. El AcFI tipo I, si está presente, se unirá al fijador, reduciendo el número de sitios de unión para la vitamina B_{12} disponibles. La B_{12} marcada ocupa cualquier sitio FI libre en la fase sólida, siendo después separada y contada. La fase sólida se separa por centrifugación y decantación y se vuelve a suspender en presencia de B_{12} marcada con ^{57}Co.

Este método está potencialmente sujeto a interferencias de la vitamina B_{12} libre en el suero del paciente. En circunstancias normales, el 99% de la B_{12} sérica está fijada, pero este tipo de método puede estar sujeto a interferencias si el paciente tiene valores elevados de B_{12} libre circulante, como puede ser el caso tras el tratamiento con vitamina B_{12} intramuscular.

Métodos ELISA para los anticuerpos antifactor intrínseco tipos I y II

Se incuba el suero en presencia de FI unido a una fase sólida de forma que los sitios de unión tanto del tipo I como del II estén libres para unir AcFI[58]. El exceso de suero no unido se elimina y la fase sólida es posteriormente incubada con anti-IgG humana marcada con un conjugado (p. ej., peroxidasa de rábano picante). El conjugado no unido se elimina y se añade el sustrato para desarrollar la señal, que es proporcional a la cantidad de AcFI en el suero original. La especificidad del análisis para el anticuerpo anti-FI dependerá de la pureza del FI en la fase sólida. Los distintos ELISA utilizan factor intrínseco porcino purificado o factor intrínseco recombinante, y los estudios sobre control de calidad para el anticuerpo antifactor intrínseco de la UKNEQAS han mostrado resultados positivos, variables según los diferentes tipos de ELISA, reflejando quizás las distintas sensibilidades y la especificidad de los sueros de los pacientes[78].

Interpretación

No se dispone de una referencia internacional o de un material de calibración para el AcFI, por lo que los resultados de ambos tipos de métodos se expresan en unidades arbitrarias o como proporción de un punto de corte considerado como positivo por cada fabricante. Como consecuencia del uso de unidades arbitrarias y del requisito de detectar ambos anticuerpos concomitantemente, no disponemos de un material de control de calidad independiente.

INVESTIGACIÓN DE LA ABSORCIÓN DE LA VITAMINA B_{12}

En pacientes con déficit de vitamina B_{12} y que no presentan anticuerpos contra el FI, es importante determinar si la capacidad de absorber la vitamina es normal. Las pruebas de absorción deben reservarse para aquellos individuos cuyos valores bajos de B_{12} son el resultado de un déficit tisular genuino, confirmado por hallazgos clínicos o de laboratorio que lo sustenten (p. ej., macrocitosis, neutrófilos hipersegmentados, anemia megaloblástica, neuropatía, características neuropsiquiátricas o elevación de los metabolitos dependientes de la cobalamina) para evitar la investigación excesiva de los valores de B_{12} séricos «falsamente bajos o indeterminados».

La absorción de vitamina B_{12} puede evaluarse sencillamente mediante un ensayo terapéutico con una dosis oral de 100 µg de cianocobalamina y un control cuidadoso de la respuesta clínica y hematológica. Las pruebas basadas en la determinación de la excreción urinaria se describen en la siguiente sección.

SECRECIÓN URINARIA (PRUEBA DE SCHILLING)[59-61]

Principio

Normalmente, la capacidad para absorber vitamina B_{12} se mide administrando una dosis de B_{12} marcada con un radioisótopo del cobalto y midiendo el porcentaje que es excretado por la orina. Los isótopos adecuados son el ^{58}Co (semivida 71 días) y el ^{57}Co (semivida 270 días)[c]. El ^{57}Co emite radiación γ de diversas energías, siendo la más importante la de 122 keV y no emite energías no particuladas. Puede utilizarse con dosis mayores de trazador que con el ^{58}Co y es el isótopo de elección cuando se utiliza un contador de centelleo sólido. El ^{58}Co puede utilizarse con todos los métodos de recuento, pero su eficiencia como emisor es baja y se deben aportar cantidades relativamente grandes para obtener tasas de recuento adecuadas. La cianocobalamina, más estable que la hidroxicobalamina, es la forma preferible para el marcaje.

Método

Administrar una dosis oral de 1,0 µg (37 kBq) de vitamina B_{12} radiactiva (cianocobalamina) en unos 200 ml de agua a un paciente que haya estado en ayunas durante toda la noche y, al mismo tiempo, dar 1 mg de cianocobalamina no radiactiva por vía intramuscular como dosis de carga. El paciente debe guardar ayuno durante 2 h más. Recoger toda la orina de 24 h y medir la radiactividad de esta orina y de un estándar que consista en una dosis idéntica de B_{12} radiactiva convenientemente diluida en agua. Calcular el porcentaje de la dosis excretada en la orina de la siguiente forma:

$$\frac{\text{Recuento total por minuto en orina de 24 h} \times 100}{\text{Recuento por minuto en el estándar (= dosis de prueba)}}$$

Puede ser conveniente preparar al mismo tiempo 10 dosis de prueba de la solución de depósito. Hacer lo siguiente utilizando recipientes estériles:

1. Diluir el contenido en agua hasta 100 ml.
2. Tomar 100 ml para el estándar y diluirlos en 100 ml de agua; este estándar es una dilución 1:10.000 de la dosis de prueba.
3. Repartir el resto en volúmenes de 10 ml.
4. Almacenar las dosis y el estándar a 4 °C.
5. Mezclar adecuadamente la orina recogida en 24 h y calcular la radiactividad en volúmenes iguales de orina y de estándar.
6. Calcular el porcentaje de la dosis de prueba excretada de la siguiente forma:

$$\frac{\text{Recuento de orina por minuto} \times \text{volumen de orina (ml)} \times 100}{\text{Recuentos del estándar por minuto} \times \text{dilución del estándar}}$$

Interpretación de los resultados

La excreción normal en la orina es de más del 10% de la dosis de prueba en las primeras 24 h cuando se utiliza la cianocobalamina como dosis de carga; en pacientes con anemia perniciosa o con déficit de vitamina B_{12} asociado con malabsorción intestinal, la excreción es habitualmente inferior al 5%, mientras que en pacientes con una ingesta dietética inadecuada la absorción será normal. Los resultados con la hidroxicobalamina son generalmente superiores que con la cianocobalamina[61,62].

En la anemia perniciosa se puede incrementar la absorción añadiendo factor intrínseco oral, mientras que en la malabsorción resultante de un defecto en la absorción intestinal no se produce la corrección. La segunda dosis de prueba con FI[d] (parte II de la prueba de Schilling) puede darse 48 h después de la primera, siempre que se administre una inyección intramuscular de vitamina B_{12} de carga 24 h después de la primera dosis por vía oral.

Errores potenciales

La recogida incompleta de la orina es una causa habitual de error. En aquellas nefropatías donde pueda haber un retraso de la excreción, se deberá recoger la orina durante 24 h más. El déficit de vitamina B_{12} o de folato puede causar una malabsorción temporal de B_{12}[63]. Por tanto, las pruebas de

[c] La vitamina B_{12} radiactiva se puede obtener de GE Healthcare/Amersham International: el vial CR3P consiste en ^{58}Co-B_{12} (10 µg de B_{12} con actividad de 0,37 MBq) y el vial CR51P es ^{57}Co-B_{12}.

[d] El FI recombinante humano se puede obtener de Cobento Biotech A/S, DK8000, Aarhus C, Dinamarca. E-mail: info@cobento.dk; véase Bor MV, Fedosov SN, Laursen NB, Nexø E 2003. El FI recombinante humano expresado en las plantas es adecuado para su uso en la determinación de la vitamina B_{12}. Clinical Chemistry 49:2081-2083.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

absorción deben realizarse cuando los pacientes están repletos de B_{12} o, si los resultados son discrepantes, repetir la prueba a los 2 meses. Se ha demostrado que la aclorhidria, resultante de una gastritis atrófica o tras una gastrectomía parcial, se asocia con una absorción normal de vitamina B_{12} acuosa pero con malabsorción de la B_{12} unida a la proteína[64]. La yema de huevo o el suero de pollo se han utilizado como «comida para la prueba de Schilling»[65-67].

Recuento corporal total

El recuento corporal total requiere un equipamiento especializado, como se describe en el capítulo 15. El principio consiste en contar la absorción a los 14 días de la administración de la dosis y del recuento original. El porcentaje retenido es habitualmente superior al 30% y a menudo incluso mayor del 50%, mientras que en la anemia perniciosa se retiene menos del 20% con una corrección de un 15% o más tras la adición del FI.

CAPACIDAD DE FIJACIÓN DE LA VITAMINA B_{12} DEL SUERO O DEL PLASMA: DETERMINACIÓN DE LA TRANSCOBALAMINA

Principio

La transcobalamina I (TC I) fija el 80% o más de la vitamina B_{12} sérica total, conociéndose el complejo B_{12}-TC I como holohaptocorrina. La TC II es la proteína de transporte minoritaria y más importante, ya que suministra B_{12} a los tejidos. El complejo B_{12}-TC II se conoce como holotranscobalamina (HoloTC) y del 6 al 25% de la B_{12} sérica total se transporta en forma de este complejo. Se cree que la HoloTC es el primer metabolito de la vitamina B_{12} que disminuye cuando la absorción de B_{12} es inadecuada. Las TC II y III están, por lo general, virtualmente insaturadas, a menos que el individuo esté recibiendo tratamiento con vitamina B_{12}. Las TC II y III deben por tanto medirse previamente al tratamiento con B_{12}. Las TC I y III (fijadores R) son proteínas glucosiladas que difieren en su componente de azúcar. La leucemia mieloide crónica, la mielofibrosis y otros trastornos mieloproliferativos se caracterizan por valores aumentados de TC I y, por tanto, de B_{12} sérica total. El cáncer hepático primario (hepatoma fibrolamelar) también se asocia con la síntesis de grandes cantidades de una forma anómala de TC I. Se ha sugerido que algunos valores bajos de B_{12} sin evidencia de déficit de B_{12} pueden deberse a la reducción de la concentración de los fijadores R[68]. La ausencia congénita de los fijadores R TC I y III ocasiona que las concentraciones de vitamina B_{12} sérica sean muy bajas, pero sin evidencia de déficit de B_{12}[69]. En la ausencia congénita de TC II, que ocasiona una pancitopenia y una megaloblastosis fulminante en los 2 meses siguientes al nacimiento, la B_{12} sérica es normal, la capacidad no saturada de fijación de la B_{12} está disminuida como consecuencia de una TC II ausente y la absorción de la B_{12} está reducida; la prueba de supresión de la desoxiuridina es anómala y se corrige con vitamina B_{12}.

CAPACIDAD DE FIJACIÓN DE LA VITAMINA B_{12} NO SATURADA E IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA TRANSCOBALAMINA

La determinación de la capacidad de fijación de la vitamina B_{12} no saturada se realiza raras veces y sólo se encuentra disponible en los laboratorios de referencia. Los detalles del método se describen en la novena edición de este libro. Su principal utilidad es la detección del déficit de transcobalamina I como causa de una concentración de vitamina B_{12} sérica muy baja sin las características clínicas del déficit de cobalamina. También se requiere para diagnosticar el, por otra parte raro, déficit de la TC II. Además, se ha utilizado la prueba como un marcador tumoral para el cáncer hepático primario.

Intervalos de referencia para las transcobalaminas

El intervalo normal para la capacidad de fijación de la vitamina B_{12} no saturada en suero es 670-1.200 ng/l; para el plasma recogido en EDTA-fluoruro de sodio es 505-1.208 ng/l[70], TC I 49-132 ng/l, TC II 402–930 ng/l y TC III 80–280 ng/l.

ANÁLISIS DE LA HOLOTRANSCOBALAMINA

Principio

Cerca del 6 al 20% de la vitamina B_{12} está unida a la TC II formando el complejo HoloTC, que es fisiológicamente activo; es esta forma la que es captada por las células. Los valores de la vitamina B_{12} holotranscobalamina (HoloTC) son de 30–160 pmol/l. El resto de la vitamina B_{12} sérica está unida a la haptocorrina, o TC I. La haptocorrina está implicada en el transporte de la vitamina B_{12} al hígado y, por tanto, a la circulación enterohepática. La haptocorrina fija también la B_{12} de los contenidos gástricos, y las proteasas pancreáticas liberan la B_{12} de la haptocorrina antes de su captura por el FI. Se cree que la HoloTC es el primer metabolito que disminuye tras la ingesta o la absorción reducida de vitamina B_{12}[12,13,71]. Axis-Shield comercializa un sistema de análisis (v. nota al pie en la pág. 140). La utilidad clínica de este método está aún por definir en su totalidad y las ventajas de la HoloTC en comparación con la determinación del metabolito permanecen sin aclarar. Puede ser un marcador sensible de la malabsorción de cobalamina[72]. La cuantificación de la saturación de la transcobalamina puede aumentar su utilidad.

Radioinmunoanálisis de HoloTC

El radioinmunoanálisis de HoloTC[73] utiliza microesferas magnéticas recubiertas con un anticuerpo monoclonal

contra la transcobalamina humana para capturar la transcobalamina y consigue la separación de la haptocorrina mediante un separador magnético. A continuación se añade un trazador ^{57}Co B_{12} junto con un agente reductor y un desnaturalizante para destruir la unión de la HoloTC. Cuanto se añade FI con fijador para la vitamina B_{12}, la B_{12} libre y el trazador compiten por la unión. El trazador no unido se elimina por centrifugación y la fracción unida se mide utilizando un contador gamma. La radiactividad medida refleja la competición entre el trazador y la vitamina B_{12} unida a la transcobalamina (es decir, la HoloTC). La concentración de vitamina B_{12} en la muestra se calcula a partir de una curva de calibración utilizando HoloTC recombinante humana. Se necesita una muestra de 0,4 ml. El coeficiente de variación es inferior al 10%, el límite de detección del análisis es 10 pmol y el tiempo del análisis es de 4 h.

Cuantificación de la saturación de transcobalamina

Nexo y cols.[74,75] describieron un método que permitía la determinación de la TC total y de la HoloTC. El método utiliza B_{12} modificada mediante tratamiento ácido y fijada a cuentas magnéticas, que puede después utilizarse para eliminar la TC no saturada o apoTC del suero. La HoloTC restante se mide mediante ELISA. De esta forma, se pueden medir la TC total y la HoloTC y cuantificar la saturación de la TC (HoloTC/TC total).

En un estudio realizado en 137 donantes de sangre sanos, el intervalo de referencia para la HoloTC fue de 40-150 pmol/l. El 10% de la TC circulante está saturada con un intervalo de referencia del 5 al 20%. Del 15 al 50% de la B_{12} está unida a la TC. En sujetos con déficit de B_{12}, la HoloTC era de 2 a 34 pmol/l y la saturación de la TC era de 0,4 a 3%, bastante por debajo del intervalo de referencia, proporcionando un punto de corte diferente de los sueros normales. El método de Nexo combina un ELISA[74] sensible para la TC con un procedimiento simple para la eliminación de la TC no saturada o apoTC.

AGRADECIMIENTOS

Ian McDowell, Andrew Gorringe, Rachel Still, Stuart Moat, Richard Ellis, professor Mark Worwood, y el Grupo de la B_{12} del Cardiff Health Hospital discutieron los temas y aportaron consejos útiles. Gracias también a Shirley Hamilton por su estímulo para finalizar el capítulo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Waters AH Mollin DL 1963 Observations on the metabolism of folic acid in pernicious anaemia. British Journal of Haematology 9:319-327.
2. Jewsbury ECO 1954 Subacute combined degeneration of the cord and achlorhydric peripheral neuropathies without anaemia. Lancet 3:307-312.
3. Healton EH, Savage DG, Brust JCM, et al 1991 Neurologic aspects of cobalamin deficiency. Medicine 70:229-245.
4. Lindenbaum J, Healton EB, Savage DG, et al 1988 Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anaemia or macrocytosis. New England Journal of Medicine 318:1720-1728.
5. Rush D 1992 Folate supplements prevent recurrence of neural tube defects. FDA Dietary supplement Task Force. Nutrition Reviews 50:22-28.
6. Savage DG, Lindenbaum J, Stabler SP, et al 1994 Sensitivity of serum methylmalonic acid and total homocysteine for diagnosing cobalamin and folate deficiencies. American Journal of Medicine 96:239-246.
7. Nygard O, Vollset, SE Refsum H, et al 1999 Total homocysteine and cardiovascular disease. Journal of Internal Medicine 246:425-454.
8. Ridker PM, Hennekens CH, Selhub J, et al 1997 Interrelation of hyperhomocystinaemia, factor V Leiden, and risk of future venous thromboembolism. Circulation 95:1777-1782.
9. Stabler SP, Allen RH, Savage DG, et al 1990 Clinical spectrum and diagnosis of cobalamin deficiency. Blood 76:871-881.
10. Moelby L, Rasmussen K, Jensen MK, et al 1990 The relationship between clinically confirmed cobalamin deficiency and serum methylmalonic acid. Journal of Internal Medicine 228:373-378.
11. Green R 1995 Metabolite assays in cobalamin and folate deficiency. Balliere's Clinical Haematology 8:533-566.
12. Herzlich B, Herbert V 1988 Depletion of serum holotranscobalamin. II. An early sign of negative vitamin B_{12} balance. Laboratory Investigations 58:332-337.
13. Ulleland M, Eilertsen I, Quadros EV, et al 2002 Direct assay for cobalamin bound to Transcobalamin (holotranscobalamin) in serum. Clinical Chemistry 48:526-532.
14. Chanarin I 1969 The Megaloblastic Anaemias p. 348, Blackwell Scientific, Oxford.
15. Lindenbaum J, Nath BJ 1980 Megaloblastic anaemia and neutrophil hypersegmentation. British Journal of Haematology 44:511-513.
16. Rose M, Johnson I 1978 Reinterpretation of the haematological effects of anti-convulsant treatment Lancet 1:1349-1350.
17. Shojania AM, Hornady GJ 1982 Oral contraceptives: effect of folate and B_{12} metabolism. Canadian Medical Association Journal 126:244-247.
18. Lassen HCA, Henriksen A, Neukirch F, et al 1956 Treatment of tetanus: severe bone marrow depression after prolonged nitrous oxide anaesthesia. Lancet 270:527-530.
19. Chanarin I 1979 The megaloblastic anaemias, 2nd ed., p.193, Blackwell, Oxford.
20. Hoffbrand AV Newcombe BFA, Mollin DL 1966 Method of assay of red cell folate activity and the value of the assay as a test for folate deficiency. Journal of Clinical Pathology 19:17-28.
21. Phekoo K, Williams Y, Schey SA, et al 1994 Folate assays serum or red cell? Journal of the Royal College of Physicians of London 31:291-295.
22. Lavoie A, Tripp E, Hoffbrand AV 1974 The effect of vitamin B12 deficiency on methylfolate metabolism and pteroylpolyglutamate synthesis in human cells. Clinical Science and Molecular Medicine 47:617-630.
23. Perry J, Lumb M, Laundy M, et al 1976 Role of vitamin B_{12} in folate coenzyme synthesis. British Journal of Haematology 32:243-248.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

24. Jaffe JP, Schilling RE 1991 Erythrocyte folate levels: a clinical study. American Journal of Hematology 36:116-121.
25. Selhub J, Jacques PF, Wilson PWF, et al 1993 Vitamin status and input as primary determinants of homocystinaemia in an elderly population. Journal of the American Medical Association 270:2693-2698.
26. Nelson B, Pfeiffer CM, Margolis S, et al 2004 Solid-phase extraction-electrospray ionization mass spectrometry for the quantification of folate in human plasma or serum. Analytical Biochemistry 325:41-51.
27. Pfeiffer CM, Fazili Z, McCoy L, et al W Gunter 2004 Determination of folate vitamers in human serum by stable isotope dilution tandem mass spectrophotometry and comparison with radioassay and microbiologic assay. Clinical Chemistry 50:423-432.
28. Thorpe S, Sands D, Heath AB, et al 2004 An international standard for whole blood folate: evaluation of a lyophilised haemolysate in an international collaborative study. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 42:533-539.
29. Curtis AD, Mussett MV, Kennedy DA 1986 British Standard for human serum vitamin B_{12}. Clinical and Laboratory Haematology 8:135-147.
30. Bagley PJ, Selhub J 1998 A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. Proceedings of the National Academy of Science 95:13217-13220.
31. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, et al 1996 Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase and plasma homocysteine concentrations. Circulation 93:7-9.
32. O'Broin SD, Kelleher BP 1992 Microbiological assay on microtitre plates of folate in serum and red cells. Journal of Clinical Pathology 45 344-347.
33. Givas J, Gutcho S 1975 pH dependence of the binding of folate to milk binder in radioassay of folates. Clinical Chemistry 21:427-428.
34. Bain BJ, Wickramasinghe SN, Broom GW, et al 1984 Assessment of the value of a competitive protein binding radioassay of folic acid in the detection of folic acid deficiency. Journal of Clinical Pathology 37:888-894.
35. Omer A 1969 Factors influencing the release of assayable folate from erythrocytes. Journal of Clinical Pathology 22:217-221.
36. Netteland B, Bakke OM 1977 Inadequate sample preparation as a source of error in determination of erythrocyte folate by competitive binding radioassay. Clinical Chemistry 23:1505-1506.
37. Shane B, Tamura T, Stokstad ELR 1980 Folate assay: a comparison of radioassay and microbiological methods. Clinica Chimica Acta 100:13-19.
38. Gorringe AP, Ellis R, McDowell IFW, et al 2004 Role of serum methylmalonic acid, homocysteine and transcobalamin II in the diagnosis of vitamin B_{12} deficiency [Abstract 77]. British Journal Haematology 125 (Suppl 1):12.
39. Rasmussen K 1989 Solid phase sample extraction for rapid determination of methylmalonic acid in serum and urine by a stable isotope dilution method. Clinical Chemistry 35:260-264.
40. Hoffman G, Aramaki S, Blum-Hoffman E, et al 1989 Quantitative analysis for organic acids in biological sample: batch isolation followed by gas chromatographic-mass spectrometric analysis. Clinical Chemistry 35:587-595.
41. Schneede J, Ulleland PM 1993 An automated assay for methylmalonic acid in serum and urine based on derivatization with 1-pyrenyldiazomethane, liquid chromatography and fluorescence detection. Clinical Chemistry 39:392-393.
42. Schneede J, Ulleland PM 1995 Application of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection for routine determination of methylmalonic acid in human serum. Analytical Chemistry 67:812-819.
43. Allen RH, Stabler SP, Savage DG, et al 1990 Diagnosis of cobalamin deficiency. I. Usefulness of serum methylmalonic acid and total homocysteine concentrations. American Journal of Hematology 34:90-98.
44. Rasmussen K, Moller J, Ostergaard K, et al 1990 Methylmalonic acid concentrations in serum of normal subjects: biological variability and effect of oral l-isoleucine loads before and after intramuscular administration of cobalamin. Clinical Chemistry 36:1295-1299.
45. Ulleland PM, Refsum H, Stabler SP, et al 1993 Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. Clinical Chemistry 39:1764-1779
46. Rasmussen K Moller J 2001 Methodologies of testing. In: Carmel R Jacobsen DW (eds) Homocysteine in health and disease, p. 9-20, Cambridge University Press, Cambridge.
47. Kataoka H, Takagi K, Makita M 1995 Determination of total plasma homocysteine and related aminothiols by gas chromatography with flame photometric detection. Journal of Chromatography B: Biomedical Applications 664:421-425.
48. Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, et al 1987 Quantitation of total homocysteine, total cysteine, and methionine in normal serum and urine using capillary gas chromatography-mass spectrometry. Analytical Biochemistry 162: 185-196.
49. Magera MJ, Lacey JM, Casetta B, et al 1999 Method for the determination of total homocysteine in plasma and urine by stable isotope dilution and electrospray tandem mass spectrometry. Clinical Chemistry 45:1517-1522.
50. Shipchandler MT, Moore EG 1995 Rapid fully automated measurement of plasma homocysteine with the Abbott Imx analyzer. Clinical Chemistry 41:991-994.
51. Pfeiffer CM, Twite D, Shih J, et al 1999 Method comparison for total plasma homocysteine between the Abbott Imx analyzer and an HPLC assay with internal standardization. Clinical Chemistry 45:152-153.
52. Pfeiffer CM, Huff DL, Smith SJ, et al Comparison of plasma total homocysteine measurements in 14 laboratories: an international study. Clinical Chemistry 45:1261-1288.
53. Nexo E, Engbaek F, Ueland PM, et al 2000 Evaluation of novel assays in clinical chemistry: quantification of plasma total homocysteine. Clinical Chemistry 46:1150-1156.
54. Andersson A, Isaksson A, Hultberg B 1992 Homocysteine export from erythrocytes and its implications for plasma sampling. Clinical Chemistry 38:1311-1315.
55. Wickramasinghe SN, Matthews JH 1988 Deoxyuridine suppression: biochemical basis and diagnostic applications. Blood Reviews 2:168-177.
56. Slingerland DW, Cararelli JA, Burrows BA, et al 1984 The utility of serum gastrin levels in assessing the significance of low serum B_{12} levels. Archives of Internal Medicine 144: 1167-1168.
57. Shackleton PJ, Fish DI, Dawson DW 1989 Intrinsic factor antibody tests. Journal of Clinical Pathology 42:210-212.
58. Waters HM, Smith C, Howarth JE, et al 1989. A new enzyme immunoassay for the detection of total type I and type

II intrinsic factor antibody. Journal of Clinical Pathology 42:307-312.
59. Schilling RF 1953 Intrinsic factor studies. II. The effect of gastric juice on the urinary excretion of radioactivity after the oral administration of radioactive vitamin B_{12}. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 42:860-866.
60. International Committee for Standardization in Haematology 1981 Recommended method for the measurement of vitamin B_{12} absorption. Journal of Nuclear Medicine 22: 1091-1093.
61. Wallis J, Clark DM, Bain BJ 1986 The use of hydroxocobalamin in the Schilling test. Scandinavian Journal of Haematology 37:337-340.
62. England JM, Snashall EA, De Silva PM 1981 Comparison of the DICOPAC with the conventional Schilling test. Journal of Clinical Pathology 34:1191-1192.
63. Herbert V 1969 Transient (reversible) malabsorption of vitamin B_{12}. British Journal of Haematology 17:213-219.
64. Gozzard DI, Dawson DW, Lewis MJ 1987 Experiences with dual protein bound aqueous vitamin B_{12} absorption test in subjects with low serum B_{12} concentrations. Journal of Clinical Pathology 40:633-637.
65. Doscherholmen A, McMahon J, Ripley D 1978 Inhibitory effect of eggs in vitamin B_{12} absorption: description of a simple ovalbumin ^{57}Co-vitamin B_{12} absorption test. British Journal of Haematology 33:261-272.
66. Doscherholmen A, Slivis S, McMahon J 1983 Dual Schilling test for measuring absorption of food bound and free vitamin B_{12} simultaneously. American Journal of Clinical Pathology 80:490-495.
67. Dawson DW, Sawers AH, Sharma RK 1984 Malabsorption of protein bound vitamin B_{12} British Medical Journal 288: 675-678.
68. Carmel R 1988 R-binder deficiency: a clinically benign cause of cobalamin deficiency. Journal of the American Medical Association 250:1886-1890.
69. Jacob E, Herbert V 1975 Measurement of unsaturated "granulocyte-related" (TCI and TCIII) and "liver-related" (TCII) binders by instant batch separation using a microfine precipitate of silica (QUSO G32). Journal of Laboratory and Clinical Medicine 88:505-512.
70. Scott JM, Bloomfield FJ, Stebbins R, et al 1974 Studies on derivation of transcobalamin III from granulocytes: enhancement by lithium and elimination by fluoride of in vitro increments in vitamin B_{12}-binding capacity. Journal of Clinical Investigation 53:228-239.
71. Nexo E, Christensen A, Hvas Ab, et al 2002 Quantification of holotranscobalamin, a marker of vitamin B_{12} deficiency. Clinical Chemistry 48 561-562.
72. Lindgren A, Kilander A, Bagge E, et al 1999 Holotranscobalamin: a sensitive marker of cobalamin malabsorption. European Journal of Clinical Investigation 29:321-329.
73. Ulleland M, Eilertsen I, Quadros EV, et al 2002 Direct assay for cobalamin bound to transcobalamin (holotranscobalamin) in serum. Clinical Chemistry 48:526-532.
74. Nexo E, Christensen A, Petersen TE, et al 2000 Measurement of transcobalamin by ELISA. Clinical Chemistry 46:1643-1649.
75. Nexo E, Christensen A, Hvas A, et al 2002 Quantification of holotranscobalamin, a marker of vitamin B_{12} deficiency. Clinical Chemistry 48:561-562.
76. Blackmore S, Lee A, Hamilton MS 2005 The impact of sample stabilisation with sodium ascorbate on the analysis of serum folate in the UKNEQAS Haematinics surveys. Clinica Chimica Acta 355 UKNP 1.3 S459.
77. Blackmore S, Pfeiffer C, Hamilton MS, et al 2005 Recoveries of folate species from serum pools sent to participants of the UKNEQAS Haematinics scheme in February and March 2004. Clinica Chimica Acta 355 UKNP 1.2 S459.
78. Lee A, Blackmore S, Hamilton MS 2005 A new external quality assessment (EQA) Scheme for Intrinsic factor antibody (IFAb) assays: a key diagnostic criterion for pernicious anaemia. Clinica Chimica Acta 355 UKTP 4.42 S297.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

9 Métodos de laboratorio utilizados para la investigación de las anemias hemolíticas

S. Mitchell Lewis y David Roper

Investigación de la anemia hemolítica 162
Hemoglobina plasmática 163
- Recogida de muestras 163
- Método de la peroxidasa 163
- Método espectrofotométrico 163

Haptoglobina sérica 164
- Método de la electroforesis 164
- Método de la inmunodifusión radial (IDR) 165
- Intervalos normales 166
- Significado 166

Hemopexina sérica 167
Examen de la metahemalbúmina en plasma (o en suero) 167
- Prueba de Schumm 167
- Estimación cuantitativa por espectrometría 167

Demostración de la hemosiderina en orina 168
- Método 168

Pruebas químicas del catabolismo de la hemoglobina 168
- Bilirrubina sérica 168
- Urobilina y urobilinógeno 169
- Prueba cualitativa para el urobilinógeno y la urobilina en orina 169

Porfirinas 169
- Demostración del porfobilinógeno en orina 170
- Ácido aminolevulínico 170
- Demostración de las porfirinas en orina 170
- Examen espectroscópico de las porfirinas en orina 171

Pigmentos de hemoglobina anómalos 171
- Examen espectroscópico de la metahemoglobina y la sulfahemoglobina en sangre 172
- Determinación de la metahemoglobina 172
- Método de detección de la sulfahemoglobina 173
- Demostración de la carboxihemoglobina 174
- Identificación de la mioglobina en orina 174

Normalmente, los hematíes sufren una lisis a los 120 días de vida aproximadamente. En la anemia hemolítica, la vida media del eritrocito está acortada. Las causas pueden dividirse en tres grupos:

1. Defectos en los hematíes por disfunción del metabolismo controlado por enzimas, hemoglobinas anómalas y talasemias.
2. Pérdida de la integridad estructural de la membrana eritrocitaria y del citoesqueleto en la esferocitosis hereditaria, la eliptocitosis, la hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) y en el daño por anticuerpos autoinmunes y asociados a fármacos.
3. Daños por factores externos como traumatismos mecánicos, trastornos microangiopáticos, púrpura trombocitopénica trombótica y toxinas químicas.

Al final de su vida normal, los hematíes se destruyen en el sistema reticuloendotelial del bazo, el hígado y la médula ósea. En algunas anemias hemolíticas, la hemólisis puede ocurrir fundamentalmente en el sistema reticuloendotelial (extravascular), aumentando muy poco la concentración plasmática de hemoglobina (Hb). En otros trastornos, se produce una hemólisis en mayor grado dentro del torrente sanguíneo (hemólisis intravascular): la Hb plasmática aumenta sustancialmente y, en algunos casos, la cantidad de Hb así liberada puede ser suficiente para hacer que la Hb sea excretada por la orina (hemoglobinuria). Sin embargo, a menudo existe una combinación de ambos mecanismos. Las dos rutas por las que se metaboliza la Hb obtenida a partir de los hematíes lisados se ilustran en la figura 9.1.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

INVESTIGACIÓN DE LA ANEMIA HEMOLÍTICA

Los fenómenos clínicos y de laboratorio propios del aumento de la hemólisis reflejan la naturaleza del mecanismo hemolítico, dónde se está produciendo la hemólisis y la respuesta de la médula ósea a la anemia que se origina por la hemólisis; esta respuesta puede ser la hiperplasia eritroide y la reticulocitosis.

La investigación de los pacientes que se piensa que pueden presentar una anemia hemolítica comprende varias etapas distintas: detección de la existencia de un aumento de la hemólisis; determinación del tipo de mecanismo hemolítico y realización del diagnóstico exacto. En la práctica, los procedimientos a menudo se solapan porque el diagnóstico, en algunos casos, puede ser obvio para el observador experimentado mediante un simple vistazo a través del microscopio a la extensión sanguínea del paciente.

Recomendamos el siguiente esquema práctico de investigación. En cada grupo, las pruebas se enumeran en orden de importancia y aplicación práctica.

¿Existen pruebas de un aumento de la hemólisis?

1. Cálculo de la Hb; recuento reticulocitario; inspección de una extensión sanguínea en busca de esferocitos, eliptocitos, células contraídas de forma irregular, esquistocitos o autoaglutinación (v. cap. 5).
2. Prueba del aumento de la bilirrubina sérica no conjugada y de la excreción del urobilinógeno urinario; medición de la haptoglobina o de la hemopexina.
3. Detección de Hb o de hemosiderina urinarias.

¿Cuál es el tipo de mecanismo hemolítico?

1. Prueba de la antiglobulina directa (PDA) con antisueros de amplio espectro.
2. Prueba de la fragilidad osmótica y la lisis con glicerol.
3. Medición de la Hb en orina y de la Hb plasmática, y prueba de Schumm.

¿Cuál es el diagnóstico exacto?

1. Si se sospecha una anemia hemolítica hereditaria:
   a) Determinación de la fragilidad osmótica a las 24 h de incubación a 37 °C; inestabilidad eritrocitaria a los 45 °C; prueba de detección del déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) eritrocitaria; análisis de la piruvatocinasa eritrocitaria; análisis de otras enzimas eritrocitarias implicadas en la glucólisis, y cálculo del glutatión eritrocitario (v. cap. 10).
   b) Cálculo del % de Hb A2 y de Hb F; electroforesis para Hb anómalas; pruebas para la falciformación; pruebas para Hb inestables; parámetros del hemograma, especialmente el volumen corpuscular medio (VCM) y la Hb corpuscular media (HCM); análisis genético (v. cap. 12).
   c) Demostración de las proteínas de la membrana y del citoesqueleto eritrocitarios (espectrina, etc.) mediante electroforesis en gel y radioinmunoanálisis específico.
2. Si se sospecha una anemia hemolítica autoinmune adquirida:
   a) Prueba de la antiglobulina directa utilizando antisueros antiinmunoglobulina y anticomplemento;

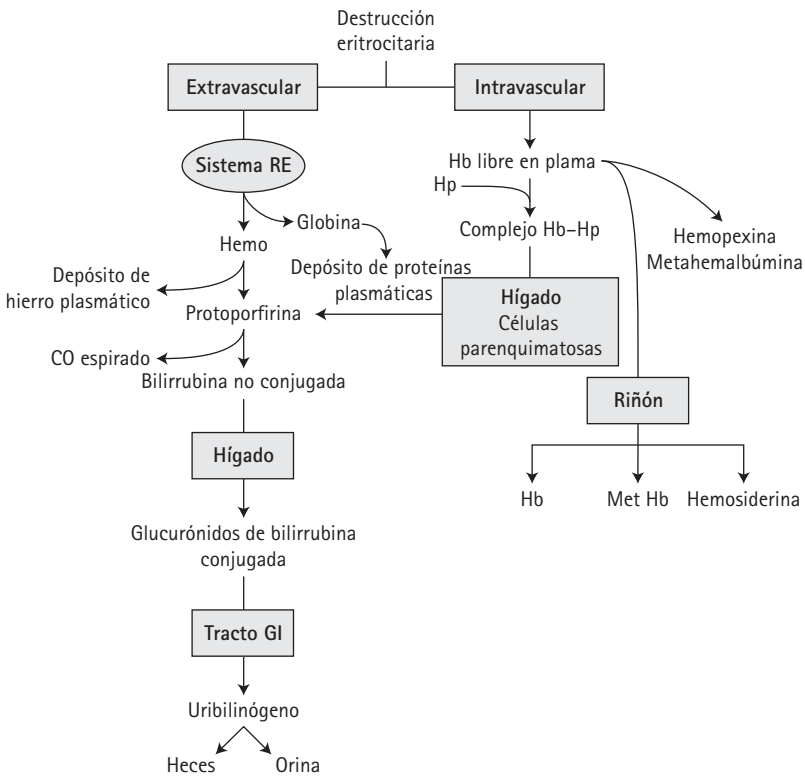


Figura 9.1. Ruta catabólica de la hemoglobina.

pruebas para los autoanticuerpos en el suero del paciente; titulación de aglutininas frías; prueba de Donath–Landsteiner; electroforesis de las proteínas séricas; demostración de la amplitud térmica de los autoanticuerpos; pruebas para la aglutinación y/o lisis por los autoanticuerpos de las células tratadas con enzimas, y pruebas para la lisis de las células normales por autoanticuerpos (v. cap. 11).

3. Si se sospecha una anemia hemolítica inducida por fármacos:
   a) Prueba de detección de la G6PD eritrocitaria; prueba de la estabilidad del glutatión; tinción de los cuerpos de Heinz; identificación de la metahemoglobina (Hi) y de la sulfahemoglobina (SHb), y pruebas de los anticuerpos relacionados con fármacos.
4. Si se sospecha un estrés mecánico:
   a) Morfología eritrocitaria; recuento plaquetario; pruebas de función renal; pruebas de coagulación; análisis del fibrinógeno, y pruebas para los productos de degradación de la fibrina/fibrinógeno (v. cap. 16).
5. En los casos poco claros:
   a) Estudio de la HPN (p. ej., prueba del suero acidificado [prueba de Ham], prueba de la lisis por sucrosa, etcétera) (v. cap. 11).
   b) Medición de la vida media de los hematíes del paciente (v. cap. 15).
   c) Si se contempla la posibilidad de esplenectomía, determinación de las áreas de hemólisis mediante imagen por radionucleidos (v. cap. 15).

HEMOGLOBINA PLASMÁTICA

Los métodos para calcular la Hb plasmática se basan en: *a)* reacción de la peroxidasa, y *b)* medición directa de la Hb por espectrometría. En el método de la peroxidasa, la acción catalítica de las proteínas que contienen hemo da lugar a la oxidación de la tetrametilbencidina[a] por el peróxido de hidrógeno que da un color verde con cambios a azul y finalmente a violeta rojizo. La intensidad de la reacción puede compararse en un espectrómetro con la producida por soluciones conocidas de Hb. La Hi y la Hb se miden juntas.

En el plasma se detecta un tinte rosado a simple vista cuando la concentración de Hb es superior a los 200 mg/l. Cuando la Hb plasmática es superior a 50 mg/l, puede medirse como cianuro de hemoglobina (HiCN) o como oxihemoglobina con un espectrómetro a 540 nm[1] (v. pág. 24). Las concentraciones inferiores pueden también medirse de manera fiable siempre que los datos espectrofotométricos de la concentración/absorbancia den una curva lineal que pase por el origen. Esta posibilidad la proporciona el Low Hb HemoCue, que puede medir de manera fiable la Hb plasmática a una concentración de 100 mg/l[2] o superior.

[a] Es un análogo de la bencidina que puede utilizarse con las precauciones estándar de seguridad para el manejo de cualquier químico tóxico; la bencidina en sí misma es una sustancia carcinógena, cuyo uso está prohibido en muchos países.

Recogida de muestras

Hay que hacer todo lo posible para evitar la hemólisis durante la recogida y la manipulación de la sangre. En este sentido, posiblemente sea preferible utilizar una jeringa en vez de un sistema de tubo al vacío. Es esencial una venopunción limpia; se debe utilizar una jeringa de plástico y una aguja de un calibre relativamente grande. Cuando se haya extraído la cantidad necesaria de sangre, hay que desprender la aguja con cuidado y añadir 9 volúmenes de sangre a un volumen de citrato sódico 32 g/l. La hemólisis puede reducirse al mínimo si se recoge la sangre a través de una aguja de gran calibre directamente en un tubo centrífugo siliconizado que contenga heparina y se separa el plasma sin demora.

Método de la peroxidasa[3]

Reactivos

Compuesto de bencidina

Disolver 1 g de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina en 90 ml de ácido acético glacial y rellenar con agua hasta 100 ml. La solución se mantendrá durante varias semanas en una botella oscura a 4 °C.

Peróxido de hidrógeno

Diluir 1 volumen de H_2O_2 al 3% («10 vols.») en 2 volúmenes de agua antes de utilizarlo.

Ácido acético

Utilizar 100 g/l de ácido acético glacial.

Estándar

Se diluye una muestra sanguínea con un contenido conocido de Hb en agua hasta una concentración final de 200 mg/l. Es conveniente utilizar una solución estándar de HiCN como fuente de la Hb.

Método

Añadir 20 µl de plasma a 1 ml del reactivo de bencidina en un tubo de vidrio grande. Al mismo tiempo, preparar un tubo de control, en el que se sustituye el plasma por 20 µl de agua y un tubo estándar que contenga 20 µl de la Hb estándar. Añadir 1 ml de la solución con H_2O_2 a cada tubo y mezclar bien el contenido.

Dejar reposar la mezcla a unos 20 °C durante 20 min y después añadir 10 ml de la solución de ácido acético a cada tubo; después de mezclarlo, dejar reposar los tubos durante 10 min más. Comparar las soluciones coloreadas a 600 nm utilizando como blanco el color desarrollado por el tubo de control. Si la Hb del plasma que se analiza está anormalmente elevada, se puede medir con el método utilizado para la sangre total (descrito más adelante).

Método espectrofotométrico

A partir de una muestra de sangre normal, preparar un hemolizado de 80 g/l (v. pág. 26).

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Diluir al 1:100 con tampón de fosfato a pH 8 para obtener una concentración de Hb de 800 mg/l. Mediante 6 diluciones dobles consecutivas con tampón fosfato, preparar un conjunto de 7 lisados estándar con valores que vayan de los 800 a los 12,5 mg/l.

Leer la absorbancia de cada solución a 540 nm utilizando el agua como blanco. Preparar un gráfico de calibración marcando las lecturas de la absorbancia (en el eje y) contra la concentración de Hb (en el eje x) en un papel gráfico aritmético y dibujar la curva. Comprobar que la curva sea lineal.

Leer la absorbancia del plasma directamente a 540 nm utilizando el agua como blanco y leer la concentración de Hb a partir del gráfico de calibración. Si la absorbancia es mayor que el máximo valor trazado en el gráfico, repetir la lectura con una muestra diluida con el tampón.

Cuando se disponga de la modificación del hemoglobinómetro HemoCue (v. pág. 163), rellenar la cubeta especial con plasma y realizar la prueba de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.

Intervalo normal

El intervalo normal es de 10 a 40 mg/l; se pueden obtener valores inferiores cuando se recoge la sangre en un tubo de centrífuga siliconizado con heparina (como se ha mencionado previamente).

Significado del aumento de la hemoglobina plasmática

La Hb liberada por la rotura intra o extravascular de los hematíes interacciona con las haptoglobinas plasmáticas para formar el complejo Hb-haptoglobina[4] que, debido a su tamaño, no atraviesa el filtro glomerular, pero es eliminado de la circulación y degradado por las células reticuloendoteliales. La Hb que excede la capacidad de las haptoglobinas para fijarla atraviesa el filtro glomerular; a continuación se excreta parcialmente por la orina sin formar complejos, produciendo hemoglobinuria y es parcialmente reabsorbida por los túbulos glomerulares proximales donde se descompone en hemo, hierro y globina. El hierro se retiene en las células y se excreta finalmente por la orina (hemosiderina). El hemo y la globina se reabsorben hacia el plasma.

El hemo forma complejos con la albúmina denominados metahemalbúmina y con la hemopexina (v. pág. 167); la globina compite con la Hb para formar un complejo con la haptoglobina. En efecto, el valor de la Hb plasmática aumenta significativamente en aquellas anemias hemolíticas cuya hemólisis es tan grave que toda la haptoglobina disponible se ha unido completamente. Los valores más elevados se encuentran cuando la hemólisis se produce principalmente en la corriente sanguínea (hemólisis intravascular). De esta forma, la hemoglobinemia marcada, con o sin hemoglobinuria, puede encontrarse en la HPN, en la hemoglobinuria paroxística por frío, en el síndrome de las hemaglutininas frías, en la fiebre de las aguas negras, en la hemoglobinuria de la marcha y en otras anemias hemolíticas mecánicas (p. ej., tras la cirugía cardíaca). En las anemias hemolíticas autoinmunes de tipo caliente, la anemia de células falciformes y la β-talasemia grave, el valor de la Hb plasmática puede estar ligera o moderadamente aumentado; sin embargo, en la esferocitosis hereditaria, en la que la hemólisis se produce fundamentalmente en el bazo, los valores son normales o aparecen muy ligeramente aumentados.

El hemo en el epitelio tubular proximal sufre una degradación posterior y se transforma en bilirrubina con liberación del hierro, parte del cual es retenido en el interior de las células unido a proteínas como la ferritina y la hemosiderina. Cuando la hemólisis es grave, el exceso de Hb que se encuentra en el filtrado glomerular determina que se acumule la hemosiderina intracelular en las células tubulares glomerulares; cuando estas células se descamen, la hemosiderina aparecerá en la orina (v. pág. 168).

La presencia de un exceso de Hb en el plasma es un signo fiable de hemólisis intravascular únicamente si el observador puede estar seguro de que la lisis no ha sido causada durante o después de la extracción de la sangre. Hay que excluir también la coloración del plasma por ciertos alimentos y aditivos alimenticios.

La Hb puede aumentar en plasma como consecuencia del ejercicio violento, así como en los corredores profesionales o no profesionales. Ello es debido al traumatismo mecánico causado por el impacto continuo de la planta del pie contra las superficies duras[4].

HAPTOGLOBINA SÉRICA

La haptoglobina es una glucoproteína que se sintetiza en el hígado. Está formada por dos pares de cadenas α y dos pares de cadenas β. Con la hemólisis, la Hb libre se disocia rápidamente en los dímeros de las cadenas α y β; las cadenas α se unen ávidamente con las cadenas β de la haptoglobina en el plasma o en el suero para formar un complejo que puede diferenciarse de la Hb libre por separación cromatográfica en columnas o por su migración alterada en la posición α_2 en la electroforesis.

También es posible la medición directa de la haptoglobina mediante turbidimetría o nefelometría y por inmunodifusión radial[5]. Los métodos descritos más adelante son la electroforesis en acetato de celulosa y la inmunodifusión radial.

Método de la electroforesis[6,7]

Principio

Se añaden al suero cantidades conocidas de Hb. El complejo Hb-haptoglobina se separa mediante electroforesis en acetato de celulosa; en cada muestra se identifica la presencia de Hb libre y unida y se calcula la cantidad de haptoglobina observando dónde aparece la Hb libre.

Reactivos

Tampón (pH 7,0, fuerza iónica 0,05)

Su composición es $Na_2HPO_4.H_20$ 7,1 g/l, 2 volúmenes; $NaH_2PO_4.H_2O$ 6,9 g/l, 1 volumen. Almacenar a 4 °C.

Hemolizados
Deben prepararse como se describe en la página 243. Ajustar la Hb a 30 g/l con agua y seguir diluyendo esta preparación con agua para obtener un lote de soluciones con concentraciones de Hb de 2,5; 5; 10; 20, y 30 g/l. Estas soluciones son estables a 4 °C durante varias semanas.

Tinción
Disolver 0,5 g de *o*-dianisidina (3,3'-dimetoxibencidina) en 70 ml de etanol al 95%; antes de utilizarlo, añadir simultáneamente 10 ml de tampón acetato a pH 4,7 (acetato de sodio 2,92 g, ácido acético glacial 1 ml, agua hasta 1 l), 2,5 ml de H_2O_2 al 3% (10 volúmenes) y agua hasta 100 ml.

Solución de aclarado
Compuesta de 25 ml de ácido acético glacial y 75 ml de etanol al 95%.

Enjuague con ácido acético
Enjuagar con ácido acético glacial, a 50 ml/l.

Método
El suero se obtiene de sangre que se ha dejado coagular sin perturbaciones a 37 °C. Tan pronto como el coágulo comience a retraerse, quitar el suero con una pipeta y centrifugarlo para eliminar los hematíes en suspensión. El suero puede almacenarse a –20 °C hasta que se utilice.

Mezclar completamente 1 volumen de cada hemolizado diluido con 9 volúmenes de suero. Dejar reposar la mezcla durante 10 min a temperatura ambiente.

Impregnar unas tiras de filtro de membrana de acetato de celulosa (12 × 2,5 cm) con la solución tampón y secarlas con papel secante para eliminar todo el líquido superficial que se observe. Extender unas muestras de 0,75 ml de las mezclas de suero-hemolizado de un lado a otro de las tiras como delgadas líneas transversas. Como controles, incluir algunas tiras con suero solo y otras con lisado de Hb solo. Realizar la electroforesis a 0,5 mA/cm de ancho. Se deben obtener unos patrones de separación correctos, de aproximadamente 5-7 cm de longitud, a los 30 min (fig. 9.2).

Tras finalizar la electroforesis, sumergir las membranas en el colorante de *o*-dianisidina recién preparado durante 10 min. Después aclarar con agua y sumergir en ácido acético, 50 ml/l, durante 5 min. Sacar las membranas y colocarlas en etanol al 95% durante 1 min exactamente. Transferir las membranas a una batea que contenga una solución de aclarado recién preparada y sumergirlas durante 30 s exactamente. Mientras están aún en la solución, colocar las membranas sobre una placa de vidrio dispuesta en la batea. Sacar la placa de vidrio con las membranas sobre ella, escurrir el exceso de solución de las membranas, transferir la placa de vidrio a un horno ventilado precalentado a 100 °C y dejar que las membranas se sequen durante 10 min.

Interpretación
En la figura 9.2 se muestran los patrones de migración de la Hb libre y del complejo Hb-haptoglobina. El complejo

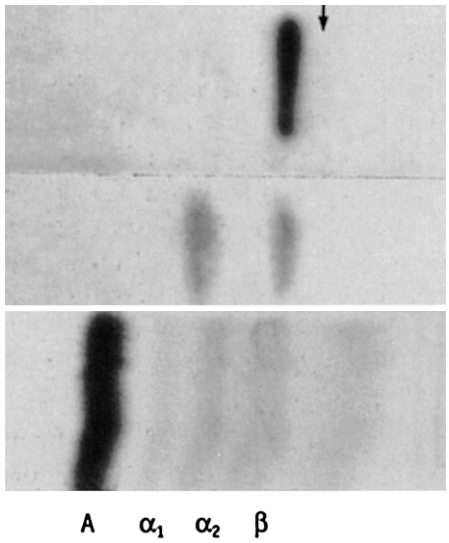


Figura 9.2. Demostración de la haptoglobina sérica. A: Suero de un caso de anemia hemolítica sin haptoglobina; la hemoglobina añadida se evidencia como una banda en la posición de la β-globulina. B: Suero normal con hemoglobina añadida; hay bandas en las posiciones de la β-globulina (Hb) y de la α_2-globulina (complejo Hb-haptoglobina) respectivamente. La línea de origen está señalada por una flecha. El patrón de la electroforesis del suero se muestra abajo (A, albúmina; α_1, α_2 y β, componentes de la globulina).

Hb-haptoglobina aparece en la posición de la α_2 globulina. Cuando hay más Hb de la que puede unirse a la haptoglobina, la Hb libre migra a la posición de la β globulina. La cantidad de haptoglobina presente en el suero se determina semicuantitativamente como la situada entre la menor concentración de Hb, que muestra únicamente una banda de Hb libre, y la tira adyacente, que muestra una banda del complejo Hb-haptoglobina. En ausencia total de haptoglobina, se observará una única banda de Hb a 2,5 g/l. En la hemólisis intravascular grave con depleción de haptoglobina, algunos de los hemo pueden unirse en la posición de la β globulina a la hemopexina (v. más adelante) y otros a la albúmina sérica para formar metahemalbúmina.

La concentración de la haptoglobina puede determinarse cuantitativamente con un densitómetro. La prueba se realiza como se ha descrito anteriormente, pero sólo se necesita un hemolizado con una Hb de 30-40 g/l. Después de que la placa se haya enfriado, se examinan las membranas con un densitómetro a 450 nm con una abertura de 0,3 mm de ancho. La densidad de la banda de haptoglobina se calcula como fracción de la Hb total en la tira electroforética:

Haptoglobina (g/l) = fracción de haptoglobina × Hb (g/l)

Método de la inmunodifusión radial (IDR)

Principio
Se distribuyen las muestras del suero de prueba y las muestras de referencia con una concentración conocida de haptoglobina en los pocillos de una placa de gel de agarosa

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

que contiene un antisuero monoespecífico para la haptoglobina humana. Los anillos de precipitación se forman por la reacción de la haptoglobina con el anticuerpo; el diámetro de cada anillo es proporcional a la concentración de haptoglobina en la muestra.

Reactivos

Placas de difusión simples[b]

Disolver la agarosa (20 g/l) en agua tamponada con fosfato en ebullición a pH 7,4 (v. pág. 589). Dejar que se enfríe hasta los 50 °C. Añadir antisuero antihaptoglobina humana de oveja o de cabra diluido al 5% en agua tamponada a pH 7,4. Mezclarlos bien sin crear burbujas. Verter el gel en bandejas de plástico delgadas (placas) hasta alcanzar un grosor inferior a 1 mm. Después de que el gel se haya formado, cortar una serie de pocillos de unos 2 mm de diámetro, y dejar una separación de unos 2 cm entre cada uno. Extraer el núcleo mediante la punta de una pipeta con una bomba de aspiración. Cubrir las placas con tapas ajustadas y almacenarlas en paquetes sellados a 4 °C hasta que se utilicen.

Sueros de referencia

En el mercado se comercializan preparaciones de suero humano con concentraciones establecidas de haptoglobina. Deben almacenarse a 4 °C.

Suero de prueba

El suero de prueba puede conservarse a 4 °C durante 2-3 días, pero si no se utiliza en ese tiempo, debe guardarse a –20 °C. Descongelarlo por completo y mezclarlo bien inmediatamente antes de utilizarlo.

Método

Dejar que la placa (en su paquete sellado) y los sueros se equilibren con la temperatura ambiente durante 15 min. Quitar la tapa de la placa. Verificar la existencia de humedad; si está presente, permitir que se evapore. Añadir 5 µl de cada suero en uno de los pocillos de la placa. Dejar transcurrir 10 min para asegurarse de que el gel absorbe completamente el suero. A continuación, cubrir la placa, devolverla a su contenedor y volver a sellar el paquete. Dejarla en una superficie plana a temperatura ambiente durante 18 h. A partir de las mediciones de los sueros de referencia, construir una curva de referencia en un papel gráfico lineal-logarítmico situando la concentración de hemoglobina en el eje vertical (escala logarítmica) y el diámetro de los anillos en la escala horizontal (escala lineal). Medir el diámetro del anillo de precipitación formado por el suero de prueba y expresar la concentración en g/l (fig. 9.3).

Intervalos normales[5]

Los resultados de la medición directa se expresan como concentración de haptoglobina; se han notificado valores de referencia ligeramente diferentes de los normales para los distintos métodos:

IDR: 0,8-2,7 g/l.
Nefelometría: 0,3-2,2 g/l.
Turbidimetría: 0,5-1,6 g/l.

Las haptoglobinas tienen una capacidad de fijación de la Hb, en el suero normal, de 0,3-2,0 g/l de Hb. Con este amplio intervalo de valores no se aprecian diferencias de género evidentes; sin embargo, tanto en hombres como en mujeres los valores aumentan después de los 70 años de edad.

Significado

Las haptoglobinas comienzan a deplecionarse cuando la producción diaria de Hb excede alrededor de dos veces la tasa normal[8]. Esto ocurre con independencia de si la hemólisis es predominantemente extra o intravascular; sin embargo, la depleción rápida, a menudo con formación de metahemalbúmina, se produce como resultado de una hemólisis intravascular ligera, incluso cuando no existe un aumento apreciable de la producción diaria total de Hb por encima de lo normal. En la enfermedad hepatocelular, puede encontrarse una concentración baja de haptoglobinas sin que haya un aumento de la hemólisis; esta concentra-

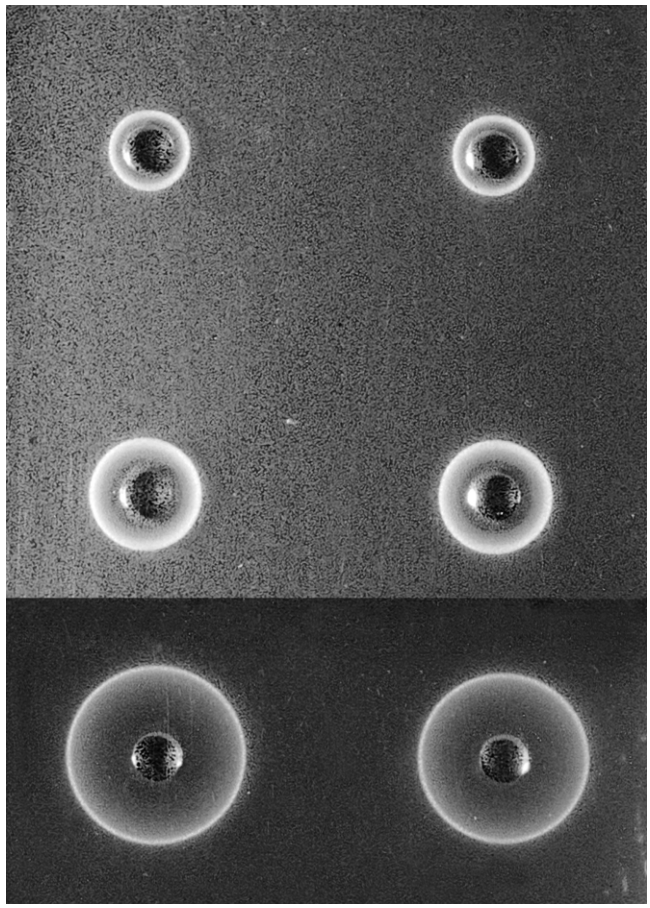


Figura 9.3. Demostración de la haptoglobina sérica. Inmunodifusión radial: concentraciones (A) baja, (B) normal y (C) elevada.

[b] Las placas de gel con el antisuero se comercializan.

ción baja es también característica de la anhaptoglobinemia congénita, que ocurre en cerca del 2% de la población blanca y en un número mayor en la negra[9]. También pueden encontrarse concentraciones bajas en las anemias megaloblásticas, probablemente debidas al aumento de la hemólisis, así como por hemorragias en los tejidos.

El complejo haptoglobina-Hb se elimina por el sistema reticuloendotelial, sobre todo en el hígado. La tasa de eliminación está influida por la concentración de Hb libre en plasma: a niveles inferiores a los 10 g/l, la $T_{1/2}$ de eliminación es de 20 min; a concentraciones superiores, la eliminación es considerablemente más lenta.

Se pueden encontrar concentraciones aumentadas de haptoglobina en el embarazo, en las infecciones crónicas, en las neoplasias malignas, en el daño tisular, en la enfermedad de Hodgkin, en la artritis reumatoide, en el lupus eritematoso sistémico, en la obstrucción biliar y como consecuencia de la terapia con esteroides o del uso de anticonceptivos orales. En estas circunstancias, una concentración de haptoglobina normal no excluye la hemólisis.

HEMOPEXINA SÉRICA

La hemopexina es una β_1 glucoproteína de peso molecular 70.000, que se sintetiza en el hígado. Desempeña una función de transporte. El hemo derivado de la Hb, que no puede unirse a la haptoglobina, forma complejos con la hemopexina o con la albúmina. Tiene una afinidad mucho más elevada por la primera y, sólo cuando se ha consumido toda la hemopexina, se unirá el hemo con la albúmina para formar la metahemalbúmina. El complejo hemo-hemopexina se elimina de la circulación (p. ej., por la acción de las células de Kupffer hepáticas).

El hemo se fija a la hemopexina en una proporción 1:1 molar; se necesitan 6 µg/ml de hemo libre para depleccionar los valores normales de fijación de la hemopexina. En los adultos normales de ambos sexos, su concentración es de 0,5-1,15 g/l (por nefelometría) o de 0,5-1,5 g/l (por electroforesis)[5]. Es inferior en los lactantes recién nacidos, en los que es de alrededor de 0,3 g/l; sin embargo, los niveles adultos se alcanzan al final del primer año de vida. En la hemólisis intravascular grave, cuando se ha deplecionado la haptoglobina, la hemopexina disminuye total o parcialmente y la metahemalbúmina plasmática aumenta. En la hemólisis menos grave, aunque es probable que la haptoglobina disminuya parcial o totalmente, la hemopexina puede ser normal o haber disminuido ligeramente. La hemopexina parece estar desproporcionadamente baja en la talasemia mayor y se pueden encontrar niveles bajos en determinados trastornos patológicos distintos de las enfermedades hemolíticas, principalmente en las enfermedades renales y hepáticas. Su concentración aumenta en la diabetes mellitus, en las infecciones y en los carcinomas[8].

La hemopexina puede medirse con los mismos métodos utilizados para la haptoglobina: la inmunodifusión radial[8] o la electroforesis[10].

EXAMEN DE LA METAHEMALBÚMINA EN PLASMA (O EN SUERO)

Un método sencillo, aunque no muy sensible, es examinar el plasma utilizando un espectroscopio manual.

Separar del plasma las células y plaquetas en suspensión obtenidas mediante centrifugación a 1.200-1.500 g durante 15-30 min. Después observarlo a la luz del sol con un espectroscopio manual utilizando la mayor profundidad posible del plasma que permita la visibilidad. La metahemalbúmina da una banda bastante débil en el rojo (a 624 nm) (fig. 9.4). Ya que habitualmente siempre hay HbO_2, se pueden observar sus bandas características en el amarillo-verde. La posición de la banda de absorción de la metahemalbúmina en el rojo puede ser fácilmente diferenciada de la de la Hi por medio de un espectroscopio de reversión.

La presunta evidencia de la presencia de pequeñas cantidades de metahemalbúmina, que dan una banda de absorción demasiado débil para ser reconocida, puede obtenerse extrayendo el pigmento con éter y convirtiéndolo después en un hemocromógeno de amonio, que da una banda más intensa en el verde (prueba de Schumm).

Prueba de Schumm

Método

Cubrir el plasma (o el suero) con una capa de éter. Añadir la décima parte de un volumen de sulfato de amonio amarillo saturado y mezclarlo con el plasma. A continuación observarlo con un espectroscopio de mano. Si hay metahemalbúmina, se observará una banda estrecha de absorción relativamente intensa a 558 nm en el verde.

Significado de la metahemalbuminemia

La metahemalbúmina se encuentra en el plasma cuando en las anemias hemolíticas en las que la lisis es predominantemente intravascular ya se ha deplecionado la haptoglobina. Es un compuesto hemo-albúmina formado después de la degradación de la Hb liberada en el plasma. Permanece en la circulación hasta que el hemo es transferido desde la albúmina hasta la hemopexina, por la que tiene una mayor avidez.

Estimación cuantitativa por espectrometría

Añadir 1 ml de un tampón fosfato isoosmótico de pH 7,4 a 2 ml de plasma (o de suero). Centrifugar la mezcla du-

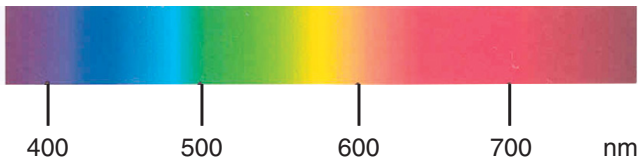


Figura 9.4. Espectro de luz visible mostrando las longitudes de onda de los colores del espectro. Varía de 380 a 780 nm. Las líneas de Fraunhofer deben observarse a aproximadamente 431, 486, 518, 527, 589, 656 y 687 nm.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

rante 30 min a 1.200-1.500 g y medir su absorbancia en un espectrofotómetro a 569 nm. Añadir unos 5 mg de ditionito sódico sólido al plasma con el sobrenadante diluido. Agitar el tubo suavemente para disolver el ditionito y dejarlo durante 5 min para permitir la reducción completa de la metahemalbúmina. Volver a medir la absorbancia. La diferencia entre las dos lecturas representa la absorbancia debida a la metahemalbúmina; su concentración puede leerse a partir de un gráfico de calibración.

Gráfico de calibración

Preparar soluciones que contengan 10-100 mg/l de metahemalbúmina disolviendo las cantidades apropiadas de hemina (bovina o equina) en un volumen mínimo de 40 g/l de albúmina de suero humano. Medir la absorbancia de cada solución en un espectrofotómetro a 569 nm y trazar un gráfico con las cifras obtenidas.

DEMOSTRACIÓN DE LA HEMOSIDERINA EN ORINA

Método

Centrifugar 10 ml de orina a 1.200 g durante 10-15 min. Transferir el sedimento a un portaobjetos, extenderlo hasta ocupar un área de 1-2 cm y dejarlo secar al aire. Fijarlo colocando el portaobjetos en metanol durante 10-20 min y teñirlo después con el método utilizado para teñir los siderocitos en las extensiones sanguíneas (v. págs. 267-268). Si hay hemosiderina, se presenta en forma de gránulos, aislados o agrupados, teñidos de azul, habitualmente con un tamaño de 1-3 µm (fig. 9.5); dichos gránulos pueden hallarse tanto dentro como fuera de las células. Si hay hemosiderina en pequeñas cantidades y, sobre todo, si su distribución en el portaobjetos es irregular o si los hallazgos son difíciles de interpretar, se debe repetir la prueba en una muestra de orina fresca recogida en un contenedor sin hierro y centrifugada en un tubo sin hierro. (Para la preparación del material de cristal sin hierro, v. pág. 592.)

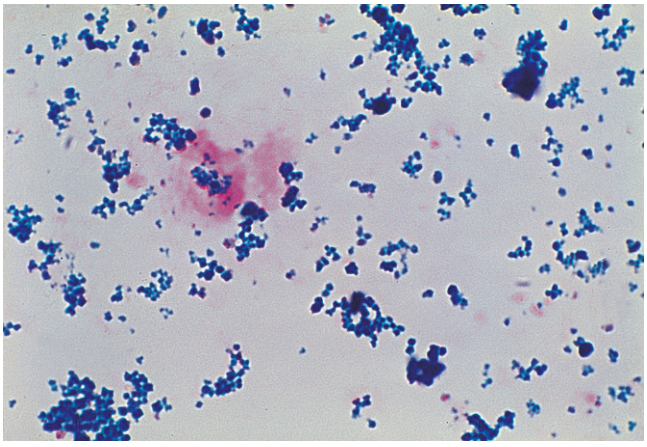


Figura 9.5. Microfotografía de un depósito urinario teñido con la reacción de Perls.

Significado de la hemosiderinuria

La hemosiderinuria es una secuela de la presencia de Hb en el filtrado glomerular. Es un signo valioso de hemólisis intravascular porque en la orina se encontrarán gránulos que contienen hierro incluso si no hay hemoglobinuria en ese momento. Sin embargo, la hemosiderinuria no se encuentra en la orina al comienzo de una crisis de hemólisis, incluso si éste se acompaña de hemoglobinemia y de hemoglobinuria, porque la Hb tiene que ser primero absorbida por las células de los túbulos renales. La descomposición intracelular de la Hb libera hierro, que es entonces reexcretado. La hemosiderinuria puede persistir durante varias semanas después de un episodio hemolítico.

PRUEBAS QUÍMICAS DEL CATABOLISMO DE LA HEMOGLOBINA

La medición de la bilirrubina plasmática o sérica, la urobilina urinaria y el urobilinógeno fecal puede proporcionar una información importante para el estudio de las anemias hemolíticas. En esta sección describiremos su interpretación y significado en las anemias hemolíticas, pero, dado que actualmente las pruebas se realizan raras veces en un laboratorio de hematología, para ver los detalles de las técnicas se remite a los lectores a los libros de texto sobre química clínica[5].

Bilirrubina sérica

La bilirrubina se encuentra en el suero de dos formas: como bilirrubina prehepática no conjugada y como bilirrubina conjugada con el ácido glucurónico. Normalmente, la concentración de bilirrubina en el suero es inferior a los 17 µmol/l (10 mg/l) y en su mayor parte es no conjugada. Como se ilustra en la figura 9.1, cuando hay un aumento de la destrucción de los hematíes, la protoporfirina da lugar a una cantidad aumentada de bilirrubina no conjugada y de monóxido de carbono. La bilirrubina se conjuga entonces en el hígado, formándose glucurónido de bilirrubina que se excreta en el tracto intestinal. La acción bacteriana convierte el glucurónido de bilirrubina en urobilina y en urobilinógeno. En las anemias hemolíticas, la bilirrubina sérica se encuentra habitualmente entre 17 y 50 µmol/l (10-30 mg/l) siendo en su mayor parte no conjugada. A veces el valor puede ser normal, a pesar de un aumento considerable de la hemólisis. Los valores superiores a 85 µmol/l (50 µg/l) y/o una gran proporción de bilirrubina conjugada sugieren la existencia de una hepatopatía. En la enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN), el valor de la bilirrubina es un factor importante para determinar la idoneidad de realizar una exsanguinotransfusión porque los valores elevados de bilirrubina no conjugada son tóxicos para el encéfalo y pueden conducir al kernicterus. En los recién nacidos normales, el valor a menudo alcanza los 85 µmol/l, mientras que en lactantes con EHRN no son infrecuentes valores de 350 µmol/l y hay que reducirlos urgentemente mediante una exsanguinotransfu-

sión. Valores de bilirrubina sérica moderadamente elevados se encuentran con frecuencia en las anemias dishemopoyéticas (p. ej., la anemia perniciosa), en las que se produce una eritropoyesis ineficaz. Aunque una parte de la bilirrubina procede de los hematíes circulantes, la mayor parte deriva de los precursores eritrocitarios en la médula ósea que han fracasado en completar su maduración.

La bilirrubina total puede medirse por espectrofotometría de lectura directa a 454 (o 461) y 540 nm; la primera es la longitud de onda seleccionada para la bilirrubina, mientras que la última corrige automáticamente cualquier interferencia causada por la Hb libre. El instrumento puede estandarizarse con soluciones de bilirrubina de una concentración conocida o con un estándar de vidrio coloreado. Otro método de lectura directa es por fotometría de reflectancia en una gota de suero añadida a una extensión con reactivo.

Un método alternativo de «química seca» es mediante la reacción con ácido sulfanílico diazotizado acuoso. Se produce un color rojo, que se compara en un colorímetro fotoeléctrico con el del estándar recién preparado o se lee en un espectrofotómetro a 600 nm. Sólo la bilirrubina conjugada reacciona directamente con este reactivo acuoso; la bilirrubina no conjugada, que está unida a la albúmina, requiere o bien la adición de etanol para liberarla de la albúmina, o bien un acelerador como el metanol o la cafeína para permitirle que reaccione. Una positividad en orina indica la existencia de un trastorno en el que hay un aumento de la bilirrubina conjugada en el suero. Hay también un método óptico sencillo, el Lovibond Comparator (Tintometer Ltd), en el que el color producido por la reacción con el ácido sulfanílico se compara con los colores de un conjunto de estándares de vidrio en un disco.

La bilirrubina se destruye por exposición a la luz solar directa o por cualquier otra fuente de luz ultravioleta (UV), incluyendo la luz fluorescente. Las soluciones son estables durante 1-2 días si se mantienen a 4 °C en la oscuridad.

Urobilina y urobilinógeno

La urobilina y su forma reducida, el urobilinógeno, se forman por acción bacteriana sobre los pigmentos biliares en el intestino. La excreción de urobilinógeno fecal en estado normal es de 50-500 µmol (30-300 mg) diarios. Aumenta en pacientes con anemia hemolítica. La medición cuantitativa del urobilinógeno fecal debería, en teoría, proporcionar una estimación de la tasa total de producción de bilirrubina. Sin embargo, éste es un método grosero para valorar la tasa de hemólisis, siendo más fiable la demostración de grados menores de hemólisis con los estudios sobre la duración de la vida de los hematíes. La excreción de urobilinógeno aumenta también en las anemias dishemopoyéticas, como la anemia perniciosa, por eritropoyesis ineficaz.

La cantidad de urobilinógeno en orina en condiciones normales es de hasta 6,7 µmol (4 mg) diarios. Sin embargo, estas mediciones dependen del método, y los laboratorios deben establecer sus propios valores normales de referencia. No constituyen un índice fiable de hemólisis, ya que el exceso de urobilinuria puede ser consecuencia tanto de una disfunción hepática como de un aumento de la destrucción eritrocitaria.

Para calcular su concentración en las heces, los pigmentos derivados de la bilis (estercobilina) se reducen a urobilinógeno, que se extrae con agua. A continuación se trata la solución con el reactivo de Ehrlich, dimetilaminobenzaldehído, que produce un color rosado, susceptible de compararse con un estándar artificial o natural en un análisis cuantitativo.

Prueba cualitativa para el urobilinógeno y la urobilina en orina

Prueba del cinc de Schlesinger

Se añaden 2 gotas de 0,5 mol/l de yodo a 5 ml de orina para convertir el urobilinógeno en urobilina. Después de mezclar la muestra y de dejarla reposar durante 1-2 min, se añaden 5 ml de una suspensión de acetato de cinc en etanol, 100 g/l, y se centrifuga la mezcla. Si hay presencia de urobilina o de urobilinógeno, aparece una fluorescencia verde en el sobrenadante claro. Si se dispone de un espectroscopio, se puede examinar el líquido buscando la banda de absorción ancha (causada por la urobilina) en la unión verde-azul (v. fig. 9.4). El urobilinógeno puede detectarse también en la orina recién emitida con los métodos de las tiras reactivas disponibles comercialmente.

PORFIRINAS

La síntesis del hemo se inicia por la acción de la succinil coenzima A y la glicina, activadas por la enzima limitadora de la producción, ALA-sintetasa. Así se produce el ácido daminolevulínico (ALA), que es el precursor de las porfirinas (fig. 9.6). Las tres porfirinas con importancia clínica en los humanos son las siguientes: protoporfirina, uroporfirina y coproporfirina, junto con su precursor ALA. La protoporfirina está ampliamente distribuida en el organismo y, además de su papel principal como precursor del hemo en la Hb y en la mioglobina, es un precursor de los citocromos y de la catalasa. La uroporfirina y la coproporfirina, que son precursores de la protoporfirina, se excretan normalmente en pequeñas cantidades por la orina y las heces. Normalmente, los hematíes contienen una pequeña cantidad de coproporfirina (5-35 nmol/l) y de protoporfirina (0,2-0,9 µmol/l). La síntesis alterada del hemo (p. ej., en las anemias sideroblásticas o en la intoxicación por plomo) y la anemia ferropénica producen un aumento de la concentración de la protoporfirina en los hematíes.

Las pruebas correspondientes se realizan habitualmente en laboratorios de química clínica, incluyendo los métodos sofisticados para la medición de las porfirinas eritrocitarias, descritos en el documento de la Association of Clinical Pathology Best Practice[11]. Las pruebas sencillas de detección cualitativa de porfobilinógeno urinario y de porfirina urinaria se describen más adelante. El porfobilinógeno urina-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

rio ayudará en el diagnóstico de las formas agudas de porfiria, sobre todo cuando el paciente está asintomático; esta prueba puede llevarnos al diagnóstico definitivo en una situación clínica crítica.

Demostración del porfobilinógeno en orina

Principio

El reactivo de Ehrlich, dimetilaminobenzaldehído, reacciona con el porfobilinógeno para producir un compuesto aldehídico rosado, que puede diferenciarse del producido por el urobilinógeno por el hecho de que el compuesto del porfobilinógeno es insoluble en cloroformo.

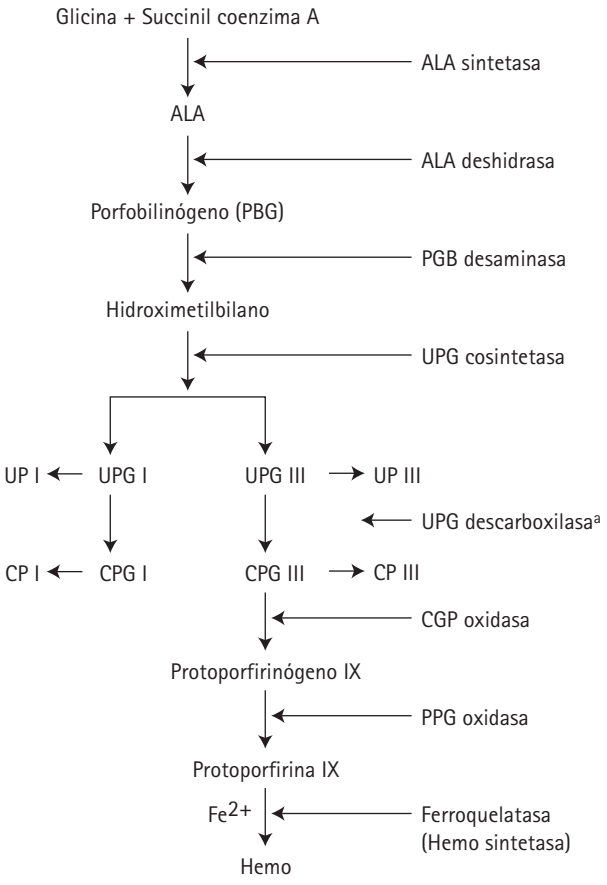
Reactivo de Ehrlich

Disolver 0,7 g de *p*-dimetilaminobenzaldehído en una mezcla de 150 ml de HCl 10 mol/l y 100 ml de agua.

Método

Hay que proteger las muestras de la luz; los mejores resultados se obtienen cuando se realiza la prueba en orina reciente. Mezclar unos cuantos mililitros de orina y un volumen igual del reactivo de Ehrlich en un tubo de ensayo grande. Añadir 2 volúmenes de una solución saturada de acetato sódico. La orina debe tener entonces un pH cercano a 5,0, dando una reacción coloreada con el papel indicador rojo Congo.

Si aparece un color rosado en la solución, añadir unos cuantos mililitros de cloroformo y agitar la mezcla concienzudamente para extraer el pigmento. El cloroformo extraerá el color debido al urobilinógeno o al indol, pero no actuará con el perteneciente al porfobilinógeno, que permanecerá en la fracción acuosa del sobrenadante. En el mercado existe un equipo para la realización de una prueba semicuantitativa utilizando resinas de intercambio iónico (Trace Laboratories; en el Reino Unido, de Alpha Laboratories). Cuando hay porfobilinógeno en la muestra, se puede estimar cuantitativamente su concentración en la orina con un equipo comercial (Biorad) o por espectrofotometría a 555 nm.



[a] *Actúa tanto sobre el isómero I como sobre el isómero III*

Figura 9.6. Biosíntesis de la porfirina. Véase la tabla 9.1 para la explicación de las abreviaturas.

Ácido aminolevulínico

Si existe ALA en la orina, se puede utilizar acetil acetona para concentrarlo. Después se hace reaccionar con el reactivo de Ehrlich de la misma forma que el porfobilinógeno para que dé una solución roja con un máximo de absorbancia a 553 nm. Puede separarse del porfobilinógeno con las resinas de intercambio iónico y estimarse cuantitativamente con un método espectrométrico.

Demostración de las porfirinas en orina

Principio

Las porfirinas presentan una fluorescencia rojo-rosada cuando se observan a la luz UV (a 405 nm). La uroporfirina puede diferenciarse de la coproporfirina por las diferentes solubilidades de las dos sustancias en una solución ácida.

Método

Mezclar 25 ml de orina con 10 ml de ácido acético glacial en un embudo de decantación y extraer dos veces con volúmenes de 50 ml de éter. Apartar la fracción acuosa (fracción 1). Lavar los extractos de éter en un embudo de decantación con 10 ml de HCl 1,6 mol/l y recoger la fracción de HCl (fracción 2). Observar ambas fracciones a la luz UV (a 405 nm) en busca de fluorescencia rojo-rosada. Su presencia en la fracción 1 indica uroporfirina; su presencia en la fracción 2 indica coproporfirina. La presencia de las porfirinas debe confirmarse espectroscópicamente (se describe más adelante).

Si se ha demostrado la presencia de uroporfirina, la reacción puede intensificarse con el siguiente procedimiento. Ajustar el pH de la fracción 1 a 3,0-3,2 con HCl 0,1 mol/l y extraer la fracción dos veces con volúmenes de 50 ml de acetato de etilo. Combinar los extractos y extraer 3 veces con volúmenes de 2 ml de HCl 3 mol/l. Observar los extractos ácidos en busca de la fluorescencia rojo-rosada a la luz UV y espectroscópicamente en busca de las bandas de la porfirina ácida.

Examen espectroscópico de las porfirinas en orina

El examen espectroscópico de porfirinas en orina se realiza en extractos, preparados como se ha descrito anteriormente, o en orina acidificada con unas cuantas gotas de HCl 10 mol/l. Si existen porfirinas, aparecerá una banda estrecha en el naranja a 596 nm y otra banda más ancha en el verde a 552 nm (v. fig. 9.4). Las pruebas cualitativas son apropiadas para detectar su presencia. Las determinaciones precisas han de hacerse por espectrofotometría o cromatografía. Las porfirinas son estables en sangre con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) hasta 8 días a temperatura ambiente si se protegen de la luz. La orina tiene que recogerse en una botella marrón o, si el contenedor es claro, mantenerlo en una bolsa que no deje pasar la luz. Si la orina se alcaliniza hasta un pH de 7-7,5 con bicarbonato sódico, durante varios días a temperatura ambiente las profirinas no sufrirán una degradación valorable.

Significado de las porfirinas en sangre y en orina

Los hematíes normales contienen concentraciones inferiores a 650 mmol/l de protoporfirina e inferiores a 64 mmol/l de coproporfirina[11]. Durante los primeros meses de vida la cantidad es mayor. En todas las edades se produce un incremento de la protoporfirina eritrocitaria en la anemia ferropénica o en el déficit de hierro latente, en la intoxicación por plomo, en las talasemias, en algunos casos de anemia sideroblástica y en la anemia por enfermedad crónica. La protoporfirina de cinc está también elevada en estos trastornos (v. pág. 129).

Normalmente se excreta por la orina una pequeña cantidad de coproporfirina (<430 nmol/día). Esto puede ponerse de manifiesto mediante la prueba cualitativa descrita anteriormente, siendo la intensidad de la fluorescencia rojo-rosada proporcional a la concentración de la coproporfirina. La excreción de coproporfirina aumenta cuando hay una eritropoyesis hiperactiva (p. ej., en las anemias hemolíticas y en las policitemias), en la anemia perniciosa y en las anemias sideroblásticas. Se eleva en las hepatopatías; la alteración renal ocasiona una disminución en su excreción. En la intoxicación por plomo hay un aumento de la protoporfirina y la coproporfirina eritrocitaria, con excreción de valores excepcionalmente elevados de ALA urinario, coproporfirina III y uroporfirina I.

En condiciones normales, el porfobilinógeno no puede evidenciarse en la orina y sólo existen trazas de uroporfirina (<50 nmol/día), no detectables por la prueba cualitativa descrita anteriormente[11]. La excreción de ALA es, por lo general, inferior a los 40 mmol/día; aumenta en la intoxicación por plomo.

El incremento en la excreción de coproporfirina urinaria que ocurre en los trastornos mencionados anteriormente se conoce como *porfirinuria*. No hay aumento en la excreción de uroporfirina. Sin embargo, las porfirias son un grupo de trastornos asociados con un metabolismo anómalo de las porfirinas.

Existen varias formas de porfiria, causadas por defectos enzimáticos específicos, difiriendo cada una en sus efectos clínicos y en el patrón de excreción de la porfirina y de sus precursores[12] (tabla 9.1). El tipo más común es la porfiria intermitente aguda, en la que el defecto en la enzima porfobilinógeno desaminasa se presenta de una de estas tres formas:

Tipo 1. Actividad enzimática disminuida junto con una cantidad reducida de la enzima en los hematíes.
Tipo 2. Actividad enzimática disminuida en los linfocitos y en los hepatocitos con actividad eritrocitaria normal.
Tipo 3. Actividad enzimática eritrocítica disminuida con cantidades normales de enzima en los hematíes.

Las distintas mutaciones de la porfobilinógeno desaminasa en los tres tipos pueden identificarse por hibridación del ADN utilizando oligonucleótidos específicos[13]. Otras formas agudas son la variegata y la coproporfiria.

El tipo hepático más habitual es la *porfiria cutánea tarda*, que origina fotosensibilidad, dermatitis y a menudo siderosis hepática; es el resultado de un defecto en la uroporfirinógeno descarboxilasa. En ésta y en las otras porfirias asociadas con dermatitis fotosensible (v. tabla 9.1) las porfirinas plasmáticas están elevadas. Hay dos tipos eritropoyéticos: la *porfiria eritropoyética congénita*, causada por una uroporfirinógeno cosintetasa defectuosa, y la *protoporfiria eritropoyética*, causada por una ferroquelatasa defectuosa. En la primera, aumenta la cantidad de uroporfirina y de coproporfirina en los hematíes y en la orina; en la última, se encuentra un aumento de la protoporfirina en los hematíes, pero la orina es normal. En la porfiria eritropoyética se puede producir una anemia hemolítica.

PIGMENTOS DE HEMOGLOBINA ANÓMALOS

La metahemoglobina (Hi, también denominada MetHb), la sulfahemoglobina (SHb) y la carboxihemoglobina (HbCO) tienen importancia clínica y cada una tiene un espectro de absorción característico demostrable por espectroscopia simple o, de forma más definitiva, por espectrometría. Si la absorbancia de una solución diluida de sangre (p. ej., 1 en 200) se mide en longitudes de onda entre 400 y 700 nm, se obtienen unos espectros de absorción característicos[14-16] (fig. 9.7 y tabla 9.2).

En la práctica, la sustancia anómala representa, por lo general, sólo una fracción de la Hb total (excepto en la intoxicación por monóxido de carbono) y su identificación y medición precisa puede ser difícil. La Hi puede medirse de forma más exacta que la SHb.

La espectroscopia de absorción es un método por el que puede caracterizarse a una sustancia según las longitudes de onda a las cuales se absorbe el espectro de color cuando la luz pasa a través de una solución de dicha sustancia. Las bandas de absorción específicas se identifican por sus posiciones (v. fig. 9.4).

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 9.1. Distribución de las porfirinas en los hematíes, la orina y las heces en las diferentes formas de porfiria

Enfermedad	Efecto clínico	Defecto enzimático[a]	Hematíes	Orina	Heces
Porfiria por déficit de ALA deshidratasa	(a)	ALA deshidratasa (porfobilinógeno sintetasa)	ZnP ALA	CP III	—
Porfiria intermitente aguda	(a)	PBG desaminasa	—	PBG ALA	—
Porfiria eritropoyética congénita	(b)	UPG III cosintetasa	UP I C PI ZnP	UP I CP I	UP I CP I
Porfiria hepática cutánea adquirida (sintomática)	(b)	UPG descarboxilasa	—	UP I CP III	—
Coproporfiria hereditaria	(a), (b)	CPG oxidasa	—	CP III	CP III
Porfiria variegata (genética sudafricana)	(a), (b)	PPG oxidasa	—	PBG[b] ALA[b]	CP III PP
Protoporfiria eritropoyética	(b)	Ferroquelatasa	PP	—	PP

[a] Véase la figura 9.6.
[b] Sobre todo durante los ataques agudos.
(a) Trastornos gastrointestinales y/o del sistema nervioso.
(b) Dermatitis por fotosensibilidad.
ALA, ácido daminolevulínico; CP, coproporfirina; CPG, coproporfirinógeno; PBG, porfobilinógeno; PP, protoporfirina; PPG, protoporfirinógeno; UP, uroporfirina; UPG, uroporfirinógeno; ZnP, protoporfirina de cinc.

Examen espectroscópico de la metahemoglobina y la sulfahemoglobina en sangre

Método

Diluir sangre 1:5 o 1:10 con agua y después centrifugarla. Examinar la solución límpida, si es posible a la luz del día, utilizando un espectroscopio manual. Es importante que se examine la zona de mayor profundidad o concentración posible de la solución que permita la visión y que se realice una búsqueda cuidadosa (con intensidades o concentraciones de solución variables) de las bandas de absorción en la parte roja del espectro a 620-630 nm. Si se observan bandas en el rojo, añadir una gota de sulfato de amonio amarillo a la solución. La banda desaparecerá si se debe a la Hi, pero no si se debe a la SHb. Con fines comparativos, la sangre lisada puede tratarse con unas cuantas gotas de solución de ferrocianuro de potasio (50 g/l), que producirá la formación de Hi; la SHb puede prepararse añadiendo a 10 ml de una dilución de sangre 1:100, 0,1 ml de una solución de clorhidrato de fenilhidrazina 1 g/l y una gota de agua previamente saturada con sulfuro de hidrógeno. A continuación se pueden comparar los espectros de los pigmentos conocidos y no conocidos mediante un espectroscopio de reversión. La banda de absorción en el rojo causada por la Hi está en los 630 nm (comparar con la metahemalbúmina a 624 nm) (v. fig. 9.4).

La Hi y la SHb se forman intracelularmente; no se encuentran en el plasma excepto en circunstancias muy excepcionales (p. ej., cuando su formación está relacionada con una hemólisis intravascular).

Determinación de la metahemoglobina[14,15]

Principio

La Hi tiene una absorción máxima a 630 nm. Cuando se añade cianuro, la banda de absorción desaparece y el cambio resultante en la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de Hi. A continuación se mide la Hb total en la muestra tras la conversión completa en HiCN mediante la adición del reactivo cianuro-ferrocianuro. La conversión medirá la oxihemoglobina y la Hi pero no la SHb. Por tanto, la presencia de una gran cantidad de SHb producirá una medición erróneamente baja de la Hb total. La turbidez del hemolizado puede solventarse con la adición de un detergente no iónico.

Reactivos

Tampón fosfato: 0,1 mol/l, pH 6,8.
Cianuro potásico: 50 g/l.
Ferrocianuro potásico: 50 g/l.
Detergente no iónico: 10 ml/l [Triton X-100[c] o Nonidet P40[d]].

Método

Lisar 0,2 ml de sangre en una solución que contenga 4 ml de tampón y 6 ml de solución detergente. Dividir el lisa-

[c] Aldrich.
[d] Por ejemplo, VWR International, Merck, BDH, Eurolab.

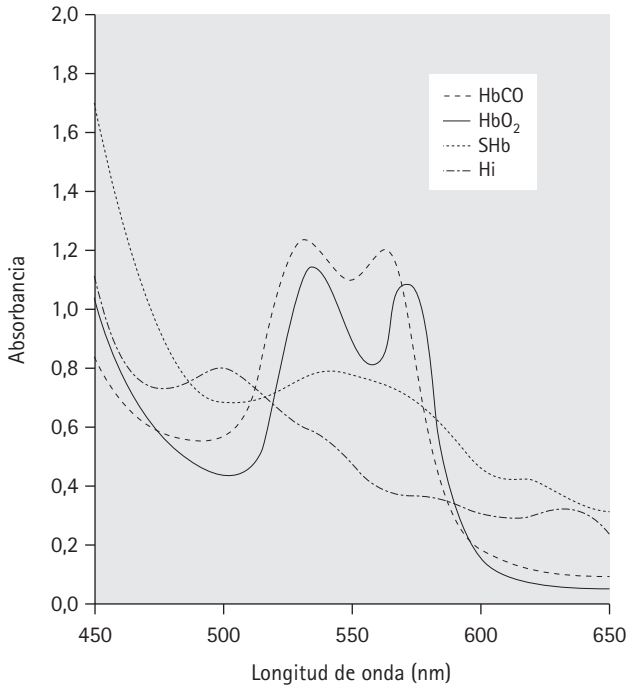


Figura 9.7. Espectros de absorción de diversos pigmentos de la hemoglobina. HbCO, carboxihemoglobina; HbO_2, oxihemoglobina; SHb, sulfahemoglobina; Hi, metahemoglobina.

do en dos volúmenes iguales (A y B). Medir la absorbancia de A en un espectrofotómetro a 630 nm (D_1). Añadir 1 gota de la solución de cianuro potásico y medir de nuevo la absorbancia tras mezclarlos (D_2). Añadir 1 gota de la solución de ferrocianuro potásico a B y, tras 5 min, medir la absorbancia a la misma longitud de onda (D_3). A continuación añadir 1 gota de la solución de cianuro potásico a B y, tras mezclarla, realizar una lectura final (D_4). Todas las mediciones se hacen contra un blanco que contiene tampón y detergente en la misma proporción que en la muestra.

Cálculo

$$\text{Hi (\%)} = \frac{D_1 - D_2}{D_3 - D_4} \times 100$$

La prueba debe realizarse antes de 1 h de la recogida de la sangre. Tras la dilución, se puede almacenar el lisado tamponado hasta 24 h a 2-4 °C sin que haya una autooxidación significativa de la Hb en Hi.

Método de detección de la sulfahemoglobina

Principio

Una lectura de la absorbancia a 620 nm mide la suma de la absorbancia de la oxihemoglobina y de la SHb en cualquier muestra sanguínea. En contraste con la oxihemoglobina, la banda de absorción causada por la SHb no varía con la adición de cianuro. La absorbancia residual, leída a 620 nm, es, por tanto, proporcional a la concentración de SHb. La absorbancia de la oxihemoglobina sola a 620 nm puede únicamente deducirse de una lectura a 578 nm y hay que determinar experimentalmente un factor de conversión, A^{578}/A^{620}, para cada instrumento en una serie de muestras sanguíneas normales[16,17]. La absorbancia de la SHb se obtiene sustrayendo la absorbancia de la oxihemoglobina de la correspondiente a la Hb total. El resultado es únicamente una aproximación, pero puede interpretarse como adecuado con fines clínicos en ausencia de un método más fiable.

Tabla 9.2. Posiciones en el espectro de la absorbancia óptima de los derivados de la hemoglobina en la espectrometría de absorción (en nm)[a]

Oxihemoglobina	542, 577
Hemoglobina desoxigenada	431, 556
Carboxihemoglobina	538, 568
Metahemoglobina	500, 630
Sulfahemoglobina	620
Metahemalbúmina	624
Hemocromógeno: (prueba de Schumm)	558

[a] Algunas son aproximaciones ya que se han notificado cifras ligeramente diferentes en diversos estudios.

Método

Mezclar 0,1 ml de sangre con 10 ml de una solución de detergente no iónico 20 ml/l (Triton X-100 o Nonidet P40; v. nota al pie de la pág. 172). Registrar la absorbancia (A) a 620 nm (Hb total). Añadir 1 gota de cianuro potásico 50 g/l y, tras dejarlo reposar durante 5 min, registrar la A a 620 nm y a 578 nm.

Cálculo

$$\text{SHb (\%)} = \frac{2 \times A^{620}\ \text{SHb}}{A^{620}\ HbO_2}$$

donde $A^{620}\ HbO_2 = \dfrac{\text{absorbancia leída a 578 nm}}{\text{factor de conversión}}$

y A^{620} SHb = A^{620} total Hb − A^{620} HbO_2.

Significado de la metahemoglobina y de la sulfahemoglobina en sangre

La Hi está presente en pequeñas cantidades en la sangre normal y constituye el 1-2% de la Hb total. Su concentración es ligeramente mayor en lactantes, sobre todo en prematuros, que en los niños de más edad y en los adultos. Una cantidad excesiva de Hi se produce como resultado de la oxidación de la Hb por fármacos y productos químicos como la fenacetina, las sulfonamidas, los colorantes de anilina, los nitratos y los nitritos.

La Hi producida por fármacos es químicamente normal y el pigmento puede reconvertirse en oxihemoglobina por la acción de agentes reductores como el azul de metileno.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Otros (aunque poco frecuentes) tipos de metahemoglobinemia se deben a un déficit heredado de la enzima NADH-Hi reductasa o bien a anomalías hereditarias de la Hb (tipos de Hb M). Los espectros de absorción de la Hb M difieren de los de la Hi normal y reaccionan lenta e incompletamente con el cianuro; su concentración no puede calcularse con el método de Evelyn y Malloy[14]. La metahemoglobinemia produce cianosis que se hace evidente con sólo 15 g/l de Hi, es decir, alrededor del 10%.

La SHb se forma habitualmente al mismo tiempo que la metahemoglobina; representa una etapa posterior e irreversible de la degradación de la Hb. Como norma, está presente a una concentración mucho más baja que la Hi.

Demostración de la carboxihemoglobina

Principio

La oxihemoglobina, pero no la HbCO, se reduce por la acción del ditionito sódico y se puede determinar el porcentaje de HbCO en una mezcla utilizando un gráfico de calibración.

Gráfico de calibración

Diluir 0,1 ml de sangre normal en 20 ml de amoníaco 0,4 ml/l y dividirlo en dos partes. Añadir 20 mg de ditionito sódico a cada una. A continuación burbujear monóxido de carbono puro en una de ellas durante 2 min, para obtener una solución al 100% de HbCO.

Añadir varios volúmenes de la solución de HbCO a la solución de Hb reducida para obtener diversas concentraciones de HbCO. Antes de transcurridos 10 min desde la adición de ditionito, medir la absorbancia de cada solución a 538 y a 578 nm. Representar el cociente A^{538}/A^{578} en un papel gráfico aritmético contra el % de HbCO en cada solución.

Método[16,17]

Diluir 0,1 ml de sangre normal en 20 ml de amoníaco 0,4 ml/l y añadir 20 mg de ditionito sódico. Medir la absorbancia en un espectrofotómetro a 538 y a 578 nm antes de 10 min. Calcular el cociente A^{538}/A^{578} y leer el % de HbCO en la sangre a partir de la curva de calibración[16] o calcularlo mediante la ecuación[16]:

$$\% \text{ HbCO} = \frac{\{2{,}44 \times A^{538}\}}{A^{578}} - 2{,}68$$

Significado de la carboxihemoglobina en sangre circulante

La afinidad de la Hb por el monóxido de carbono es 200 veces la del oxígeno. Esto significa que incluso las concentraciones bajas de monóxido de carbono conducen rápidamente a la formación de HbCO. En la sangre normal hay menos del 1% de HbCO, pero en fumadores se encuentra hasta un 10%[17,18]. También aumenta la producción y la excreción por los pulmones en las anemias hemolíticas. La concentración elevada en sangre por la inhalación del gas origina anoxia tisular y puede producir la muerte. Sin embargo, puede producirse la recuperación porque la HbCO se disocia rápidamente en presencia de concentraciones elevadas de oxígeno.

Identificación de la mioglobina en orina

La mioglobina es la proteína principal en los músculos y puede liberarse a la circulación cuando hay un daño muscular cardíaco o esquelético. Parte de ella puede excretarse por orina, donde su concentración se puede medir mediante un radioinmunoanálisis específico y relativamente sensible[19]. Dado que los espectros de absorción de la mioglobina y de la Hb son similares, aunque no idénticos, no es posible distinguirlos fácilmente por espectroscopia o por espectrometría, pero pueden separarse por cromatografía en columna[20]. Normalmente, los hombres tienen menos de 80 µg/l y las mujeres menos de 60 µg/l, aumentando ligeramente en la vejez, mientras que los niños tienen valores muy bajos[5].

BIBLIOGRAFÍA

1. Moore GL, Ledford ME, Merydith A 1981 A micromodification of the Drabkin hemoglobin assay for measuring plasma hemoglobin in the range of 5 to 2000 mg/dl. Biochemical Medicine 26:167-173.
2. Morris LD, Pont A, Lewis SM 2001 Use of a new HemoCue system for measuring haemoglobin at low concentrations. Clinical and Laboratory Haematology 23:91-96.
3. Standefer JC, Vanderjogt D 1977 Use of tetramethyl benzidine in plasma hemoglobin assay. Clinical Chemistry 23: 749-751.
4. Davidson RJL 1969 March or exertional haemoglobinuria. Seminars in Hematology 6:150-161.
5. Burtis CA, Ashwood ER 2000 NW Tietz's Fundamentals of Clinical Chemistry. 5th Edition. Saunders, Philadelphia.
6. Brus I, Lewis SM 1959 The haptoglobin content of serum in haemolytic anaemia. British Journal of Haematology 5:348-355.
7. Valeri CR, Bond JC, Flower K, et al. 1965 Quantitation of serum hemoglobin-binding capacity using cellulose acetate membrane electrophoresis. Clinical Chemistry 11:581-588.
8. Nagel RL, Gibson QH 1971 The binding of hemoglobin to haptoglobin and its relation to subunit dissociation of hemoglobin. Journal of Biological Chemistry 246:69-73.
9. Hanstein A, Muller-Eberhard U 1968 Concentration of serum hemopexin in healthy children and adults and in those with a variety of hematological disorders. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 71:232-239.
10. Heide K, Haupt H, Störiko K, et al. 1964 On the heme-binding capacity of hemopexin. Clinica Chimica Acta 10:460-469.
11. Deacon AC, Elder GH 2001 Frontline tests for the investigation of suspected porphyria: ACP Best Practice No. 165. Journal of Clinical Pathology 54:500-507.
12. Bottomley SS, Muller-Eberhard U 1988 Pathophysiology of heme synthesis. Seminars in Haematology 25:282-302.
13. Sassa S 1996 Diagnosis and therapy of acute intermittent porphyria. Blood Reviews 10:53-55.
14. Van Kampen EJ, Zijlstra WG 1965 Determination of hemoglobin and its derivates. Advances in Clinical Chemistry 8:141-187.
15. Zijlstra WG, Buursma A, van Assendelft OW 2003 Visible and near infrared absorption spectra of human and animal haemoglobin: determination and applications. VSP Publishers, Zeist, Netherlands.

16. Zwart A, van Kampen EJ, Zijlstra WG 1986 Results of routine determination of clinically significant hemoglobin derivatives by multicomponent analysis. Clinical Chemistry 32:972-978.
17. Shields CE 1971 Elevated carbon monoxide level from smoking in blood donors. Transfusion (Philadelphia) 11:89-93.
18. Russell MAH, Wilson C, Cole PV, et al. 1973 Comparison of increases in carboxyhaemoglobin after smoking "extra mild" and "non mild" cigarettes. Lancet ii:687-690.
19. Stone MJ, Willerson JT, Waterman MR 1982 Radioimmunoassay of myoglobin. Methods in Enzymology 84:172-177.
20. Cameron BF, Azzam SA, Kotite L, et al. 1965 Determination of myoglobin and hemoglobin. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 65:883-890.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

10 Investigación de las anemias hemolíticas hereditarias: anomalías enzimáticas y de la membrana

David Roper y Mark Layton

Investigación de las alteraciones de la membrana 178
Fragilidad osmótica medida por la lisis en una solución salina hipotónica 178
Principio 178
Reactivos 178
Método 178
Fragilidad osmótica tras la incubación de la sangre a 37 °C durante 24 h 179
Prueba de la citometría de flujo (fijación al colorante) 182
Pruebas del tiempo de lisis con glicerol 183
Prueba del tiempo de lisis con glicerol acidificado 183
Criohemólisis 184
Autohemólisis 184
Análisis de las proteínas de la membrana 186
Detección del déficit enzimático en las anemias hemolíticas hereditarias 186
Pruebas de detección del déficit de G6PD y otros déficits de la ruta de las pentosas fosfato 186
Prueba de detección por fluorescencia del déficit de G6PD 187
Prueba de reducción de la metahemoglobina 189
Detección de los heterocigotos en el déficit de G6PD 189
Pruebas citoquímicas para demostrar los déficits en el metabolismo de los hematíes 190
Demostración de las células con déficit de G6PD 190
Pruebas de detección de la pirimidina-5′-nucleotidasa 191
Principio 191
Análisis de las enzimas eritrocitarias 192
Puntos generales de la técnica 192
Análisis de la G6PD 193
Identificación de las variantes de la G6PD 195
Análisis de la piruvatocinasa 195
Estimación del glutatión reducido 196
Prueba de estabilidad del glutatión 197
2,3-difosfoglicerato 198
Determinación del 2,3-difosfoglicerato eritrocitario 198
Curva de disociación del oxígeno 200
Determinación de la curva de disociación del oxígeno 200

Los diversos pasos iniciales que se deben seguir en la investigación de un paciente con sospecha de anemia hemolítica se indican en el capítulo 9, y los cambios en la morfología eritrocitaria que pueden encontrarse en las anemias hemolíticas se ilustran en el capítulo 5. En este capítulo se describen procedimientos útiles a la hora de investigar anemias hemolíticas que podrían tener su origen en defectos en la membrana eritrocitaria o en el déficit de enzimas importantes en el metabolismo eritrocitario.

La identificación precisa de un defecto enzimático está más allá del ámbito de actuación de la mayoría de los laboratorios de hematología, pues puede precisar el aislamiento y la depuración de la enzima, así como la determinación y definición de sus propiedades cinéticas y estructurales. En un laboratorio de rutina, es suficiente con identificar la naturaleza general del defecto, ya esté situado en la membrana o en las rutas metabólicas del hematíe. En el caso de supuestos déficits metabólicos, se debe realizar un esfuerzo para señalar, si es posible, la enzima implicada. La primera parte de este capítulo describe las pruebas de detección de la esferocitosis, incluyendo la esferocitosis hereditaria (EH) y el déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD). Las últimas secciones del capítulo describen los análisis de enzimas específicas y la medición del 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) y del glutatión reducido (GSH).

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

La mayoría de los análisis enzimáticos están normalizados por el International Council for Standardization in Haematology (ICSH). También existen equipos comerciales disponibles para la realización de algunos análisis cuantitativos y de pruebas de detección. Se han indicado en las secciones relevantes.

INVESTIGACIÓN DE LAS ALTERACIONES DE LA MEMBRANA

La prueba de fragilidad osmótica indica el cociente entre el área de superficie y el volumen de los hematíes. Su mayor utilidad está en el diagnóstico de la esferocitosis hereditaria. La prueba puede también utilizarse para la detección de las talasemias. Los hematíes esferocíticos, independientemente de la causa, captan menos agua en una solución hipotónica antes de romperse que los hematíes normales.

Otras pruebas que demuestran los defectos de la membrana eritrocitaria incluyen el tiempo de lisis con glicerol, la criohemólisis y, más específicamente, el análisis de las proteínas de la membrana.

FRAGILIDAD OSMÓTICA MEDIDA POR LA LISIS EN UNA SOLUCIÓN SALINA HIPOTÓNICA

Principio

El método que se describe se basa en el de Parpart y cols.[1]

Se mezclan pequeños volúmenes de sangre con grandes cantidades de soluciones salinas tamponadas a diversas concentraciones. La fracción de hematíes lisados en cada concentración de solución salina se determina colorimétricamente. La prueba se realiza normalmente a temperatura ambiente (15-25 °C).

Reactivos

Preparar una solución madre de cloruro sódico tamponado, osmóticamente equivalente a NaCl 100 g/l (1,71 mol/l), de la siguiente forma: disolver NaCl, 90 g, Na_2HPO_4, 13,65 g (o Na_2HPO_4 $2H_2O$, 17,115 g) y NaH_2PO_4 $2H_2O$, 2,34 g en agua. Ajustar el volumen final hasta 1 l. Esta solución se mantendrá durante meses a 4 °C en una botella bien cerrada. Durante el depósito se pueden formar cristales de sal que deben volverse a disolver completamente antes de su utilización.

Al preparar las soluciones hipotónicas para su uso, es conveniente hacer en primer lugar una solución de 10 g/l a partir de la solución de depósito de NaCl 100 g/l diluyéndola con agua. Las diluciones equivalentes a 9,0; 7,5; 6,5; 6,0; 5,5; 5,0; 4,0; 3,5; 3,0; 2,0 y 1,0 g/l son concentraciones adecuadas. Las concentraciones intermedias como las de 4,75 y 5,25 g/l son útiles en el trabajo crítico y se debe utilizar una dilución adicional de 12,0 g/l para las muestras incubadas.

Es conveniente preparar 50 ml de cada dilución. Las soluciones se conservan bien a 4 °C si la esterilidad se mantiene, pero hay que revisar la presencia de moho antes de su uso y desecharlas en caso de que exista.

Método

Se puede utilizar sangre venosa heparinizada o sangre desfibrinada; la sangre oxalatada o citratada no es adecuada debido a las sales adicionales que se le han añadido. La prueba debe realizarse antes de las 2 h de la recogida con sangre almacenada a temperatura ambiente o antes de las 6 h si la sangre se ha conservado a 4 °C.

1. Depositar 5,0 ml de cada una de las 11 soluciones salinas en tubos de ensayo de 12 × 75 mm. Añadir 5,0 ml de agua al decimosegundo tubo.
2. Añadir a cada tubo 50 µl de sangre bien homogeneizada y mezclarla inmediatamente invirtiendo los tubos varias veces, evitando que se forme espuma.
3. Dejar las suspensiones a temperatura ambiente durante 30 min. Mezclar de nuevo y centrifugar después a 1.200 g durante 5 min.
4. Eliminar los sobrenadantes y calcular la cantidad de lisis en cada uno utilizando un espectrómetro con una longitud de onda establecida a 540 nm o un colorímetro fotoeléctrico provisto de un filtro amarillo-verde (p. ej., Ilford 625). Utilizar el sobrenadante del tubo 1 como blanco (osmóticamente equivalente a NaCl 9 g/l).
5. Asignar un valor de 100% de lisis a la lectura del sobrenadante del tubo 12 (agua) y expresar las lecturas de los otros tubos como porcentaje del valor del tubo 12. Representar los resultados contra la concentración de NaCl (fig. 10.1).

Notas

1. La medición de la fragilidad osmótica es un procedimiento simple que requiere un mínimo de equipamiento. Realizada cuidadosamente ofrecerá resultados gratificantes.
2. Hay que depositar la sangre en los 12 tubos con sumo cuidado. El punto crítico no consiste en que la cantidad sea exactamente 50 µl, sino en que la cantidad añadida a cada tubo sea la misma. Se recomiendan dos métodos:
   a) Utilización de una pipeta automática. Tras aspirar suavemente la sangre, enjugar la parte exterior con papel fino, cuidando de no extraer sangre del interior de la punta por capilaridad. A continuación, se vierte en la solución salina y se aclara la pipeta por dentro y por fuera varias veces hasta que no haya sangre visible en el interior de la punta.

      Hay que cambiar la punta antes de pasar al siguiente tubo. Este procedimiento lleva su tiempo y puede producir un aumento de la exposición en los primeros tubos. Es por tanto aconsejable comenzar la sincronización únicamente tras la adición de la muestra al primer tubo.
   b) Utilización de una pipeta Pasteur con un extremo terminal perfectamente plano, de 1 mm de diámetro; succionar alrededor de 1 ml de sangre evitando la formación de burbujas y enjugar el exterior de la pipeta.

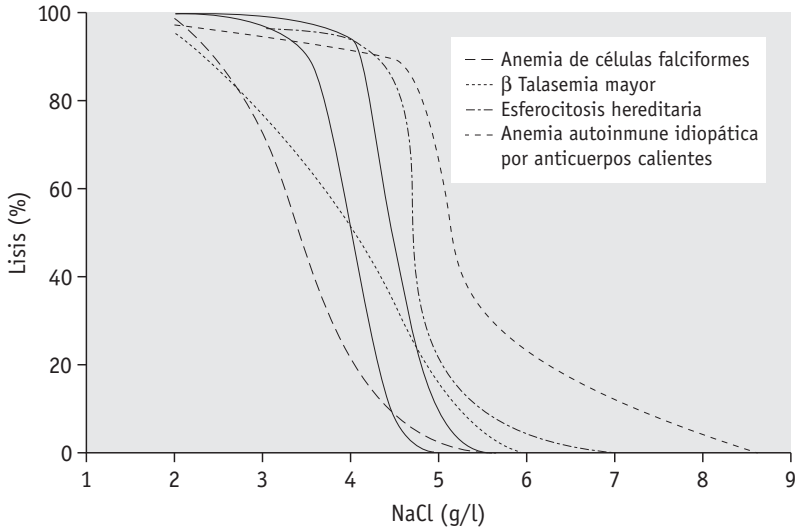


Figura 10.1. Curvas de fragilidad osmótica. Curvas de fragilidad osmótica de pacientes que presentan: anemia de células falciformes, β talasemia mayor, esferocitosis hereditaria y anemia autoinmune «idiopática» por anticuerpos calientes. El intervalo normal está indicado por las líneas continuas.

Con la pipeta sostenida verticalmente por encima del tubo 1, depositar una única gota (alrededor de 50 µl) sin que la sangre toque las paredes del tubo. A continuación depositar gotas únicas en los restantes 11 tubos.
El método **b** parece primitivo, pero con práctica es completamente satisfactorio; es también más económico y mucho más rápido que el método **a**. Con cualquiera de los métodos, la mejor forma de probar su exactitud es realizando una prueba preliminar mediante el depósito de sangre en varios tubos que contengan, todos ellos, la misma solución salina (p. ej., 3,0 o 1,0 g/l). Las lecturas en los sobrenadantes no deben diferir del 5% de cada una de ellas.

3. Si la cantidad de sangre disponible es limitada (p. ej., en niños pequeños) y el espectrómetro utiliza cubetas de 1 ml, los volúmenes pueden reducirse proporcionalmente a 1 ml de solución salina y 10 µl de sangre. Sin embargo, depositar 10 µl de sangre de forma reproducible no es tarea fácil. Con el método **b** tendríamos que utilizar una pipeta Pasteur o una pipeta capilar con un diámetro mucho más pequeño, calibrada para suministrar gotas de 10 µl de sangre. Es, por tanto, más difícil mantener la exactitud. En este caso puede ser preferible el método **a**.
4. Con el método que utiliza 50 µl de sangre y con sangre no anémica, la lectura de una lisis al 100% estará alrededor de 0,7. Con un espectrómetro moderno, cualquier cifra entre 0,5 y 1,5 es aceptable. Si el valor es inferior a 0,5, se debe repetir la prueba utilizando más sangre o menos solución salina (lo contrario si la lectura es mayor que 1,5). Con colorímetros fotoeléctricos, los valores superiores a los 0,5 no son, a menudo, muy exactos.
5. Al transferir el sobrenadante de un tubo a la cubeta del espectrómetro, hay que tener cuidado para no alterar el sedimento. Si es suficientemente denso, se puede verter el sobrenadante desde el tubo a la cubeta; en general, esto es aceptable en los espectrómetros provistos de un dispositivo automático de succión. En caso contrario, se debe utilizar una pipeta Pasteur de plástico.
6. Incluso habiendo establecido un intervalo de normalidad, es esencial incorporar siempre una muestra normal de control junto con las de los pacientes que se vayan a analizar para comprobar, por ejemplo, las soluciones salinas.

La forma sigmoide de la curva normal de fragilidad osmótica indica que los hematíes normales difieren en su resistencia a las soluciones hipotónicas. De hecho, esta resistencia varía gradualmente (osmóticamente) en función de la edad del hematíe, siendo las células más jóvenes las más resistentes y las más viejas las más frágiles. La explicación consiste en que las células viejas tienen un contenido de sodio más elevado y una capacidad reducida para bombear el sodio al exterior.

Fragilidad osmótica tras la incubación de la sangre a 37 °C durante 24 h

Método

Hay que utilizar sangre desfibrinada, teniendo cuidado para garantizar que se mantenga la esterilidad.

Incubar volúmenes de 1 o 2 ml de sangre en botellas estériles de 5 ml. Es aconsejable preparar las muestras por duplicado por si acaso una se infectase, lo que vendría indicado por la lisis macroscópica y el cambio de color.

Después de 24 h, si no hay evidencia de infección, se combinan los contenidos de las botellas duplicadas tras mezclar cuidadosamente los hematíes sedimentados en el suero suprayacente y se calcula la fragilidad como se ha descrito anteriormente.

Ya que la fragilidad puede estar notablemente aumentada (fig. 10.2), hay que preparar soluciones hipotónicas adicionales que contengan NaCl 7,0 y 8,0 g/l. Utilizar, además, una solución equivalente a NaCl 12,0 g/l porque a veces, como en la EH, se puede producir la lisis en NaCl 9,0 g/l. En este caso, emplear el sobrenadante del tubo que contiene NaCl 12,0 g/l como blanco en el cálculo colorimétrico.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

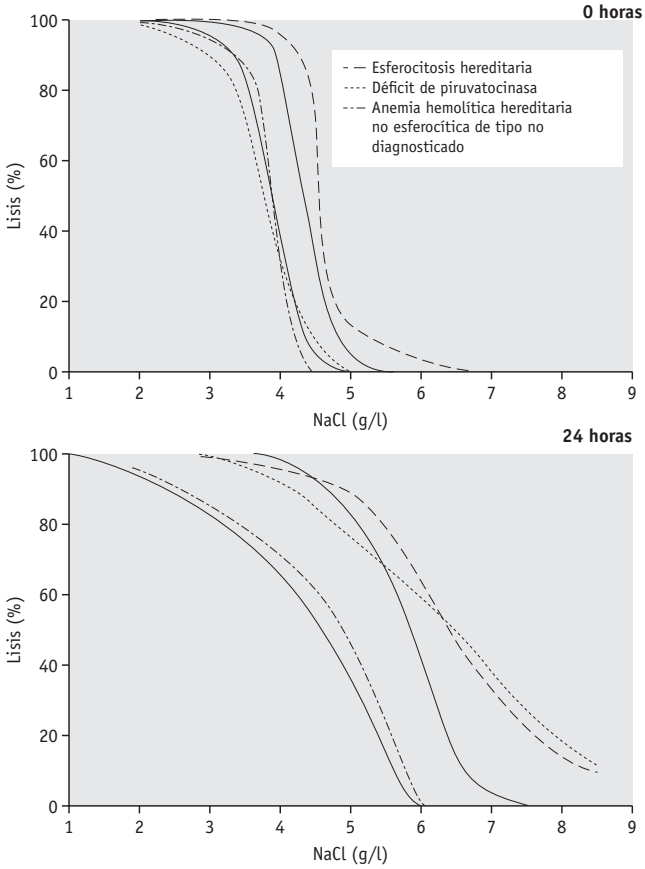


Figura 10.2. Curvas de fragilidad osmótica antes y después de incubar la sangre a 37 °C durante 24 h. Sangre de pacientes que presentan: esferocitosis hereditaria, déficit de piruvatocinasa y anemia hemolítica hereditaria no esferocítica de tipo no diagnosticado. El intervalo normal lo indican las líneas continuas.

La prueba de fragilidad tras la incubación se combina adecuadamente con la estimación de la tasa de autohemólisis espontánea (v. pág. 184).

Factores que afectan a las pruebas de fragilidad osmótica

Al realizar las pruebas de fragilidad osmótica por cualquiera de los métodos, hay que controlar tres variables capaces de afectar notablemente a los resultados, prescindiendo de la exactitud con la que se hayan preparado las soluciones salinas. Son las siguientes:

1. Los volúmenes relativos de sangre y solución salina.
2. El pH final de la sangre en la suspensión salina.
3. La temperatura a la que se realizan las pruebas.

Se elige una proporción de 1 volumen de sangre por 100 volúmenes de solución salina, porque la concentración de la sangre es tan baja que el efecto del plasma en la tonicidad final de la suspensión es despreciable. Cuando se utilizan suspensiones diluidas de sangre en solución salina es necesario controlar el pH de las soluciones hipotónicas, siendo éste el motivo por el que se añade tampón fosfato a la solución salina. Incluso así, encontraremos pequeñas diferencias entre la fragilidad de la sangre venosa y la sangre con un máximo de aireación (es decir, oxigenada). Para mayor exactitud de los resultados, se recomienda que la sangre se mezcle hasta obtener un tono rojo brillante. Por último, lo ideal es que las pruebas se realicen siempre a la misma temperatura, aunque la mayoría de las veces la temperatura ambiente es suficientemente constante.

En el artículo de Parpart y cols.[1] se describen perfectamente la amplitud del efecto del pH y de la temperatura sobre la fragilidad osmótica. El efecto del pH es el más importante: una variación de 0,1 de una unidad de pH es equivalente a alterar la concentración salina en 0,1 g/l, aumentando la fragilidad de los hematíes con la reducción en el pH. Un incremento de la temperatura reduce la fragilidad, siendo el aumento de 5 °C equivalente a aumentar la concentración salina en cerca de 0,1 g/l.

La lisis se acaba virtualmente al cabo de 30 min a 20 °C, pudiendo las soluciones hipotónicas centrifugarse al final de ese tiempo.

Murphy[2] amplió los detalles sobre los factores que afectan y controlan la hemólisis de los hematíes en las soluciones hipotónicas.

Registro de los resultados de las pruebas de fragilidad osmótica

En el pasado, la fragilidad osmótica se expresaba a menudo en términos de la mayor concentración de solución salina en la que la lisis empezaba a ser detectable (lisis inicial o resistencia mínima) y la mayor concentración de solución salina en la que se había completado la lisis (lisis completa o resistencia máxima). No obstante, es también útil registrar la concentración de solución salina que causa el 50% de la lisis (es decir, la fragilidad corpuscular media [FCM]) e inspeccionar la curva de fragilidad completa (v. fig. 10.1). Los hallazgos en condiciones normales se resumen en la tabla 10.1.

Métodos alternativos para registrar la fragilidad osmótica

Disponemos de dos métodos alternativos sencillos para registrar los resultados cuantitativamente: los datos pueden trazarse en un papel de probabilidad o se pueden dibujar las curvas de incremento de la hemólisis. Ambos métodos hacen hincapié en la heterogeneidad de la población celu-

Tabla 10.1. Fragilidad osmótica en estado normal (a 20 °C y pH 7,4)

	Sangre fresca (NaCl g/l)	Sangre incubada durante 24 h a 37 °C (NaCl g/l)
Lisis inicial	5,0	7,0
Lisis completa	3,0	2,0
FCM (50% lisis)	4,0–4,45	4,65-5,9

FCM, fragilidad corpuscular media.

lar con respecto a la fragilidad osmótica. Si las magnitudes observadas de lisis en sangre normal se representan en la escala de la probabilidad contra las concentraciones de solución salina, se puede dibujar una línea casi recta entre los puntos; la línea sólo se desvía cuando la lisis es casi completa. Este método permite leer con facilidad la FCM.

En la enfermedad, las curvas con cola desvían también la línea en diferentes grados en el otro extremo de la escala de probabilidad. Para obtener curvas de incremento de la hemólisis, se trazan las diferencias en la intensidad de la lisis entre tubos adyacentes contra las correspondientes concentraciones de solución salina. Durante la recuperación de un episodio hemolítico se pueden obtener curvas con una bimodalidad definida[3].

Interpretación de los resultados

La fragilidad osmótica de los hematíes recién extraídos refleja su capacidad de captar una cierta cantidad de agua antes de la lisis. Viene dada por el cociente volumen/área de superficie. La capacidad del hematíe normal para soportar la hipotonicidad se debe a su forma bicóncava, que permite que la célula incremente su volumen en cerca de un 70% antes de que la superficie de su membrana se distienda; una vez que se alcanza este límite se produce la lisis[4]. Los esferocitos tienen su razón volumen/área de superficie aumentada; la capacidad para captar agua antes de distender la superficie de su membrana es, por tanto, más limitada de lo normal y son, en consecuencia, particularmente susceptibles a la lisis osmótica. El incremento en la fragilidad osmótica es una propiedad de la forma esferoide de la célula y es independiente de la causa de la esferocitosis. De forma característica, las curvas de fragilidad osmótica de los pacientes con EH que no han sido esplenectomizados muestran una «cola» de células muy frágiles (fig. 10.3). Cuando se representan en el papel de probabilidad, el gráfico indica dos poblaciones de células: una muy frágil y otra normal o ligeramente frágil. Tras la esplenectomía, los hematíes son más homogéneos, y la curva de fragilidad osmótica indica un espectro más continuo de células, desde las frágiles hasta las normales.

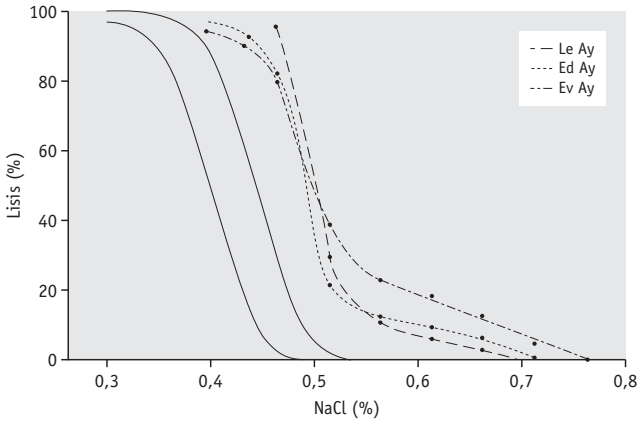


Figura 10.3. Curvas de fragilidad osmótica de tres pacientes que presentan esferocitosis hereditaria y que pertenecen a la misma familia (hermano, hermana y tío [Le Ay]). El área entre las líneas continuas representa el intervalo de normalidad.

La fragilidad osmótica reducida indica la presencia de hematíes inusualmente achatados (leptocitos) en los que el cociente volumen/área de superficie está disminuido. Tal cambio se produce en la anemia ferropénica y en las talasemias en las que los hematíes con una hemoglobina corpuscular media (HCM) y un volumen corpuscular medio (VCM) bajos son extraordinariamente resistentes a la lisis osmótica (v. fig. 10.1). Una simple prueba de fragilidad osmótica de un solo tubo sirve para la detección de las β talasemias y de algunas hemoglobinopatías en aquellos países donde hay una incidencia elevada de estas anomalías (v. pág. 581). La cantidad de membrana de los reticulocitos y de los hematíes, de los pacientes esplenectomizados, tiende a ser mucho mayor que la de las células normales y a ser osmóticamente más resistente. En las hepatopatías, los dianocitos pueden generarse por acumulación pasiva de líquidos y estas células también son resistentes a la lisis osmótica[5].

La fragilidad osmótica de los hematíes tras incubación a 37 °C durante 24 h es también un reflejo de su razón volumen/área de superficie, pero los factores que alteran esta razón son más complejos que los de los hematíes frescos. El aumento de la fragilidad osmótica de los hematíes normales que se produce tras la incubación (v. fig. 10.2) se debe principalmente a la hinchazón de las células asociada con una acumulación de sodio que excede la pérdida de potasio. Tal intercambio catiónico está determinado por las propiedades de la membrana del hematíe, que controla el flujo pasivo de iones y la competencia metabólica de la célula, que determina a su vez el bombeo activo de los cationes contra los gradientes de concentración. Durante la incubación de 24 h, el metabolismo del hematíe se acentúa y los mecanismos de bombeo tienden a fallar, siendo uno de los factores la falta relativa de glucosa en el medio.

La fragilidad osmótica de los hematíes que tienen anomalías en la membrana, como los de la EH y la eliptocitosis hereditaria (ElH), se incrementa de forma anómala tras la incubación (v. fig. 10.2). Resultados similares se producen en la estomatocitosis hereditaria[6a]. Los resultados de los hematíes que tienen un déficit glucolítico, como los del déficit de piruvatocinasa (PK), son variables. En las deficiencias graves, la fragilidad osmótica puede aumentar sustancialmente (v. fig. 10.2); sin embargo, en otros casos, la fragilidad puede verse reducida debido a que la pérdida de potasio es mayor que la ganancia de sodio. En las talasemias mayor y menor, la fragilidad osmótica está frecuentemente muy reducida tras la incubación, debido, de nuevo, a una notable pérdida de potasio[7]. Un cambio similar, aunque habitualmente menos marcado, se observa en la anemia ferropénica.

En resumen, la medición de la fragilidad osmótica eritrocitaria nos da una información valiosa sobre la normalidad de los hematíes del paciente, ya que un resultado anormal indica invariablemente la presencia de una anomalía. Sin embargo, lo contrario no es cierto (es decir, un resultado dentro del intervalo de normalidad no significa que los hematíes sean normales). Los hallazgos en algunas anemias hemolíticas se resumen en la tabla 10.2.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 10.2. Fragilidad osmótica en las anemias hemolíticas: resumen

Trastorno	Notas
A. Asociadas con un aumento de la fragilidad osmótica (FO)	
Esferocitosis hereditaria (EH)	La totalidad de la curva puede estar «desviada a la derecha» o la mayor parte de ella puede estar dentro del intervalo de normalidad pero con una «cola» de células frágiles. Curva dentro del intervalo de normalidad en 10-20% de los casos. Tras la incubación durante 24 h, las anomalías suelen ser más notables, pero aún se obtienen algunos resultados falsos negativos. La esplenectomía no afecta a la FCM pero reduce la cola de células frágiles
Eliptocitosis hereditaria (EIH)	Como en la EH, pero en general los cambios son menos notables La FO anómala se correlaciona habitualmente con la gravedad de la hemólisis (es decir, la FO es normal en las EIH no hemolíticas)
Estomatocitosis hereditaria	Como en la EH con grandes células osmóticamente frágiles y con CHCM baja
Otras anomalías hereditarias de la membrana	Resultados variables; con curvas de disociación más suaves que tienden a presentar anomalías tras la incubación durante 24 h
Anemia hemolítica autoinmune	Cola de células frágiles proporcional, en líneas generales, a la cantidad de esferocitos; resto de la curva normal (o incluso desviada a la izquierda por causa de la reticulocitosis elevada)
B. Asociadas con una reducción de la FO	
Talasemia	FCM reducida en todas las formas de talasemia, excepto en algunas α-talasemias heterocigotas; habitualmente la curva completa está desviada hacia la izquierda
Anomalías enzimáticas	FO por lo general normal (originariamente nos referimos a la anemia como no esferocítica hereditaria), pero puede observarse una cola de células altamente resistentes debidas al alto recuento de reticulocitos Tras la incubación durante 24 h, puede haber una cola de células frágiles
Xerocitosis hereditaria	Resistencia aumentada a la lisis osmótica y aumento de la CHCM
Ferropenia	Curva desviada hacia la izquierda, total o parcialmente, dependiendo de la proporción de hematíes hipocromos

CHCM, concentración de hemoglobina corpuscular media; EH, esferocitosis hereditaria; EIH, eliptocitosis hereditaria; FCM, fragilidad corpuscular media; FO, fragilidad osmótica.

PRUEBA DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO (FIJACIÓN AL COLORANTE)

Principio

La prueba de fragilidad osmótica adolece de falta de especificidad y de sensibilidad y falla en la detección de EH atípicas o leves. Además, puede verse afectada por factores no relacionados con defectos citoesqueléticos del hematíe; por ejemplo, se pueden obtener resultados positivos de los hematíes de pacientes embarazadas o que presentan anemias hemolíticas inmunitarias o de otro tipo o una insuficiencia renal. La prueba de la citometría de flujo (fijación al colorante) de King y cols.[8] mide la intensidad de la fluorescencia de los hematíes intactos marcados con eosina-5-maleimida (EMA), que reaccionan covalentemente con la Lys-430 en el primer bucle extracelular de la proteína banda 3. El dominio citoplasmático N-terminal de la banda 3 interacciona con la ankirina y la proteína 4.2, que a su vez reacciona de forma cruzada con el citoesqueleto basado en la espectrina y estabiliza la bicapa lipídica de la membrana[9]. El déficit o la anomalía de la banda 3 pueden producir una reducción de la fluorescencia. Esto se observa en los hematíes de la EH pero se ha visto también en casos de ovalocitosis del sudeste asiático, en la anemia diseritropoyética congénita tipo II y en la variante estomatocítica de la criohidrocitosis. Las muestras de sangre con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) pueden analizarse hasta las 48 h de su recogida, siempre que se hayan guardado en el refrigerador.

Reactivos

EMA

El EMA es sensible a la luz y debe mantenerse en la oscuridad, preferiblemente envuelto en papel de aluminio y conservado a 4 °C. Preparar una solución de depósito disolviendo 1 mg en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Mezclar bien y almacenar en partes alícuotas de 200 µl a –20 °C.

Solución de albúmina de suero bovino (30%) (ASB)

Disponible comercialmente. Diluir hasta el 0,5% con PBS.

PBS

Véase la página 589.

Método

Descongelar un tubo de la solución de depósito de EMA en la oscuridad y a temperatura ambiente y diluirlo con un volumen igual de PBS para obtener una solución operativa de 0,5 mg/ml. Mezclar 5 µl de concentrado de hematíes lavados con 25 µl de la solución operativa con EMA en un tubo de plástico de microcentrífuga. Preparar tubos de control con sangre de individuos normales y realizar todas las pruebas por duplicado. Dejar una gradilla con los tubos en una alacena en la oscuridad y a temperatura ambiente durante 30 min. Mezclar y devolverlos a la zona protegida de la luz durante otros 30 min.

A continuación, centrifugar los tubos en una microcentrífuga de sobremesa durante 5-10 s y eliminar con cuidado el colorante sobrenadante con una pipeta de punta fina.

Lavar los hematíes marcados tres veces con 500 µl de PBS que contenga ASB al 0,5%. El tercer lavado debería ser incoloro. Si se mantiene el color rosado, lo que sugiere la presencia de trazas de partículas colorantes que permanecen en el tubo, desechar la muestra y repetir el procedimiento de marcado de la célula.

Volver a suspender el concentrado de hematíes en 500 µl de la solución de lavado PBS-ASB. Transferir 100 µl de las células en suspensión a un tubo de plástico para citometría de flujo y añadir 1,4 ml de solución de lavado. Mantener las suspensiones celulares en la oscuridad envolviéndolas en papel de aluminio hasta que se utilicen. En cada muestra, hacer un recuento de hasta 15.000 eventos en la región de los hematíes.

Interpretación de los resultados

Los resultados deben expresarse como el cociente del valor medio de la prueba con respecto a la muestra de control. Cada laboratorio debe establecer el intervalo de referencia y los valores de corte para su propio instrumento. En nuestro laboratorio consideramos normal una razón de 0,8 o superior.

PRUEBAS DEL TIEMPO DE LISIS CON GLICEROL

La prueba de fragilidad osmótica es algunas veces engorrosa y requiere 2 ml o más de sangre total. Por tanto, no es adecuada para utilizarla en niños recién nacidos o como prueba de detección en la población. En 1974 Gottfried y Robertson[10] introdujeron la prueba del tiempo de lisis con glicerol (GLT), que consistía en una prueba en un solo tubo para medir el tiempo necesario hasta obtener una hemólisis del 50% de una muestra de sangre en una mezcla de glicerol con solución salina hipotónica tamponada. El método original tenía una sensibilidad mayor en el intervalo de resistencia osmótica, pero también podía identificar a la mayoría de los pacientes con EH por presentar un GLT_{50} más corto. Con la incubación de 24 h de las muestras y la modificación del reactivo con glicerol, se consiguió una mejor identificación de la sangre con EH a partir de la sangre normal[11]. Zanella y cols. modificaron posteriormente la prueba original reduciendo el pH[12]. Hay cierta pérdida de especificidad para la EH con la prueba del tiempo de lisis con glicerol acidificado (AGLT) en comparación con el método original, pero en la práctica esta pérdida carece de importancia.

Prueba del tiempo de lisis con glicerol acidificado[12]

Principio

El glicerol presente en una solución salina hipotónica tamponada enlentece la tasa de entrada de moléculas de agua en los hematíes, de forma que el tiempo necesario para la lisis se puede medir de forma más fácil. Igual que con la prueba de fragilidad osmótica, se puede establecer una diferencia entre los esferocitos y los hematíes normales.

Reactivos

Solución salina tamponada con fosfato

Añadir 9 volúmenes de NaCl 9,0 g/l (154 mmol/l) a 1 volumen de tampón fosfato 100 mmol/l (2 volúmenes de Na_2HPO_4 14,9 g/l añadidos a 1 volumen de KH_2PO_4 13,61 g/l). Ajustar el pH a 6,85 ± 0,05 a temperatura ambiente (15-25 °C). Este ajuste debe ser exacto.

Reactivo de glicerol (300 mmol/l)

Añadir 23 ml de glicerol (27,65 g de grado AR) a 300 ml de PBS y completar el volumen final hasta 1 l con agua.

Método

Añadir 20 µl de sangre total, anticoagulada con EDTA, a 5,0 ml de PBS con un pH de 6,85. Mezclar cuidadosamente la suspensión.

Transferir 1,0 ml a una cubeta estándar de 4 ml de un espectrómetro equipado con un registro lineal-logarítmico. Fijar la longitud de onda en 625 nm y comenzar el registro. Añadir rápidamente 2,0 ml del reactivo con glicerol a la cubeta con una jeringa de 2 ml o con una pipeta automática y mezclar bien.

La tasa de hemólisis se mide por la proporción de caída de la turbidez en la mezcla reaccionante. Los resultados se expresan como el tiempo requerido para que la densidad óptica caiga a la mitad del valor inicial ($AGLT_{50}$). La prueba puede también realizarse utilizando un colorímetro y un cronómetro.

Resultados

La sangre normal requiere más de 30 min (1.800 s) para alcanzar el $AGLT_{50}$. El tiempo consumido es similar para la sangre de los adultos normales, los niños recién nacidos y las muestras del cordón. En los pacientes con EH, el intervalo del $AGLT_{50}$ es de 25 a 150 s. Un $AGLT_{50}$ acortado puede encontrarse también en la insuficiencia renal crónica, en las leucemias crónicas y en la anemia hemolítica autoinmune; también puede hallarse en algunas mujeres embarazadas[12].

Significado del AGLT

Son aplicables los mismos principios de la prueba de fragilidad osmótica. Las células con una razón elevada de vo-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

lumen/área de superficie resisten a la hinchazón menos tiempo que las células normales. Esto se puede aplicar a todos los esferocitos, independientemente de que estén causados por la EH o por otros mecanismos. La prueba tiene una utilidad particular en la detección de familiares de pacientes con EH cuyos cambios morfológicos son demasiado pequeños para indicar con claridad si el trastorno está presente.

CRIOHEMÓLISIS

Principio

Mientras que la fragilidad osmótica es anómala en cualquier trastorno donde se produzcan esferocitos, se ha sugerido que la criohemólisis es específica de la EH[13]. Esto parece derivar del hecho de que esta última depende de factores relacionados con déficits moleculares de la membrana del hematíe más que con cambios en el cociente volumen/área de superficie. La prueba puede realizarse en sangre con EDTA de hasta 1 día.

Reactivo

Sucrosa tamponada 0,7 mol/l

23,96 g de sucrosa en 100 ml de tampón fosfato 50 mmol/l a pH 7,4. Puede almacenarse congelado en partes alícuotas de 2 ml en tubos listos para su utilización.

Método[13]

1. Centrifugar la sangre y lavar los hematíes tres veces con NaCl, 9 g/l frío (4 °C). Preparar una suspensión de 50-70% de células en solución salina y mantenerla en hielo hasta que se haga la prueba.
2. Preparar volúmenes de 2 ml de reactivo, descongelándolos si estaban congelados, y mantenerlos durante 10 min en un baño de agua a 37 °C para equilibrar la temperatura.
3. Pipetear 50 µl de la suspensión de células en cada uno de los 2 tubos del reactivo caliente, agitar en vórtex inmediatamente durante unos cuantos segundos e incubar después durante exactamente 10 min a 37 °C.
4. Transferir los tubos sin demora a un baño de hielo durante otros 10 min, agitar en vórtex durante unos cuantos segundos y después centrifugar para sedimentar las células restantes. Transferir parte del sobrenadante a un tubo limpio.
5. Preparar una solución de hemolizado al 100% pipeteando 50 µl de la muestra original en 2 ml de agua. Centrifugar y diluir 200 µl del sobrenadante en 4 ml de agua.
6. Leer la absorbancia a 540 nm de la prueba y de las muestras con lisis al 100%.

Cálculo

$$\% \text{ criohemólisis} = \left[\frac{\text{Prueba } A^{540}}{\text{Hemolizado } A^{540}} \right] \times 21$$

Interpretación

Streichman y cols.[13] constataron que el intervalo de criohemólisis en los sujetos normales era del 3-15%, mientras que en la esferocitosis hereditaria la lisis es superior al 20%. Sin embargo, se recomienda que cada laboratorio individual establezca sus propios valores de referencia para el método. El aumento de la lisis no es exclusivo de la esferocitosis hereditaria y puede observarse en la estomatocitosis hereditaria.

AUTOHEMÓLISIS: HEMÓLISIS ESPONTÁNEA DESARROLLADA EN SANGRE INCUBADA A 37 °C DURANTE 48 H

La prueba de la autohemólisis es útil para la detección inicial de los casos que se sospecha que pueden presentar una anemia hemolítica. Aporta información sobre la competencia metabólica de los hematíes y ayuda a distinguir los déficits enzimáticos y las alteraciones estructurales de la membrana si los resultados de las pruebas se consideran conjuntamente con otras observaciones, como la morfología, la herencia y la presencia o ausencia de trastornos clínicos asociados[14].

Principio

Se incuban partes alícuotas de sangre con y sin solución de glucosa estéril a 37 °C durante 48 h. Después de ese período, se mide colorimétricamente la cantidad de hemólisis espontánea.

Método

Al preparar la prueba de la autohemólisis es fundamental utilizar técnicas asépticas para mantener la esterilidad durante el período de incubación.

Utilizar sangre estéril desfibrinada y depositar cuatro muestras de 1 o de 2 ml en cinco botellas estériles de 5 ml con tapón. Retener una parte de la muestra original; separarla y almacenarla como suero de preincubación.

Añadir a dos de las botellas 50 o 100 µl de solución de glucosa estéril 100 g/l para conseguir una concentración de glucosa en sangre de al menos 30 mmol/l. Confirmar que los tapones de las botellas estén firmemente cerrados y colocar la serie de botellas en la estufa a 37 °C. Se debe utilizar en paralelo una muestra de un individuo que se sepa que tiene valores normales para usarla como control.

Tras 24 h, mezclar completamente el contenido girando suavemente los frascos sobre sí mismos. Después de una incubación de 48 h, inspeccionar las muestras buscando signos de infección y mezclar de nuevo completamente; a continuación extraer una muestra de cada botella para el cálculo del hematocrito (Hto) y de la concentración de hemoglobina (Hb), y centrifugar el resto para obtener el suero sobrenadante.

Estimar la lisis espontánea por medio de un colorímetro o de un espectrómetro a 540 nm.

Como norma, es conveniente hacer una dilución 1:10 del suero incubado en una solución de cianuro-ferrocianuro (Drabkin) (v. pág. 25), a menos que haya una hemólisis notable, en cuyo caso es más aconsejable una dilución 1:25 o 1:50. La dilución correspondiente del suero de preincu-

bación se utiliza como blanco y la dilución 1:100 o 1:200 de sangre total en la solución de Drabkin indica la cantidad total de Hb presente y sirve como estándar.

Calcular el porcentaje de lisis, permitiendo un cambio en el Hto resultante de la incubación de la forma siguiente:

$$\text{Lisis (\%)} = \frac{R_t - B}{R_0} \times \frac{D_o}{D_t} \times (1 - PCV_t) \times 100$$

donde R_o = lectura de la sangre total diluida; R_t = lectura del suero diluido a las 48 h; B = lectura del blanco; Hto_t = hematocrito en el momento t; D_o = dilución de la sangre total (p. ej., 1:200 = 0,005), y D_t = dilución del suero (p. ej., 1:10 = 0,1).

La lectura en el tiempo t se multiplica por $(1 - Hto_t)$ para dar la concentración que se encontraría si la Hb liberada se disolviera en la sangre total (es decir, en los compartimentos plasmáticos y eritrocitarios), y no en el compartimento plasmático solo.

Intervalo normal de autohemólisis

Lisis a las 48 h: sin glucosa añadida, 0,2-2,0%; con glucosa añadida, 0-0,9%.

Los resultados obtenidos son sensibles a las ligeras diferencias en la técnica y cada laboratorio debe utilizar un procedimiento cuidadosamente estandarizado y establecer su propio intervalo de normalidad. Si la cantidad de Hb liberada es pequeña, es más exacto (aunque consume más tiempo) medir la lisis por un método químico en vez de por un método espectrométrico directo (v. pág. 162). También puede medirse directamente mediante un procedimiento rápido y simple con un *HemoCue Plasma/Low Hb system*[15].

Significado del aumento de la autohemólisis

Cuando la sangre normal se incuba durante 24 h en condiciones estériles se produce poca o ninguna lisis y después de 48 h sólo hay una pequeña hemólisis[14]. Si se añade glucosa de forma que esté presente durante toda la incubación, se produce un enlentecimiento notable del desarrollo de la lisis. La cantidad de autohemólisis que ocurre a las 48 h con y sin glucosa viene determinada por las propiedades de la membrana y la competencia metabólica del hematíe. En los trastornos de la membrana como los que aparecen en la EH, la tasa de consumo de glucosa se incrementa para compensar el aumento del paso de cationes a través de la membrana[6b]. Durante la incubación de 48 h, la glucosa se consume, por tanto, con relativa rapidez, de forma que el fallo en la generación de energía se produce más rápido de lo normal a menos que se añada glucosa. Éste es uno de los factores que contribuyen al aumento de la tasa de autohemólisis en la EH. Habitualmente, aunque no siempre, la adición de glucosa a la sangre reduce la tasa de autohemólisis en la EH. Nos referimos a ella como autohemólisis tipo 1[14]. Cuando la utilización de glucosa por la ruta de la glucólisis está alterada, como en el déficit de PK, la tasa de autohemólisis a las 48 h suele estar generalmente aumentada y la glucosa no es capaz de corregir o puede incluso agravar la lisis (autohemólisis tipo 2)[6c]. Aunque se puede observar un resultado similar en la EH grave (tipo B), la imposibilidad de la glucosa, en ausencia de esferocitosis, para disminuir la autohemólisis es un signo importante de bloqueo glucolítico. La sangre de pacientes con déficit de la G6PD u otros trastornos de la ruta de las pentosas fosfato puede sufrir un ligero aumento de la autohemólisis (sin glucosa adicional), que se corrige con la adición de glucosa. Generalmente, el resultado es normal, pero el examen de la sangre incubada puede mostrar un aumento de la metahemoglobina (Hi) (analizado más adelante). No todas las deficiencias de la enzima glucolítica originan una reacción del tipo 2, por lo que un resultado de tipo 1 no excluye la posibilidad de tal defecto.

En las anemias hemolíticas adquiridas, los resultados de las pruebas de autohemólisis son variables y no muy útiles, en general, para el diagnóstico. En las anemias hemolíticas autoinmunes, puede haber un aumento de la lisis en ausencia de glucosa adicional, pero el efecto de la glucosa añadida es impredecible. En la hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), la autohemólisis de la sangre desfibrinada y aireada es habitualmente normal.

La autohemólisis puede estar aumentada en las anemias hemolíticas causadas por fármacos oxidantes o cuando existen déficits en la potencia reductora del hematíe. Al final de la incubación se podrán detectar cuerpos de Heinz, Hi o ambos. Normalmente, los hematíes producen menos del 4% de Hi tras 48 h de incubación y no se observan cuerpos de Heinz. Los hematíes que contienen una Hb inestable presentan también cuerpos de Heinz al final del período de incubación y cantidades aumentadas de Hi.

Los nucleósidos adenosina, guanosina e inosina, igual que la glucosa, disminuyen la tasa de autohemólisis cuando se añaden a la sangre. De forma notable, el trifosfato de adenosina (ATP) retrasa sorprendentemente la hemólisis en el déficit de PK, aunque la glucosa por sí misma es ineficaz[16]. El ATP no atraviesa la membrana del hematíe.

La prueba de la autohemólisis adolece de falta de especificidad. Este hecho ha generado una gran crítica de la misma, incluyendo la sugerencia de que no hay indicación para realizarla en la detección de los déficits hereditarios de la sangre[17]. La mejor forma para detectar los déficits metabólicos de los hematíes es indudablemente medir su consumo de glucosa, su producción de lactato y su contribución al metabolismo de la ruta de las pentosas fosfato. Desgraciadamente, estas mediciones son difíciles y sólo pueden ser realizadas por laboratorios especializados. La prueba de la autohemólisis aporta alguna información sobre la competencia metabólica de los hematíes y ayuda a distinguir las alteraciones de la membrana de los déficits enzimáticos.

En resumen, creemos que la prueba de la autohemólisis tiene aún utilidad para la investigación de pacientes que presenten o que puedan presentar una anemia hemolítica crónica por las siguientes razones:

1. Si el resultado es completamente normal, es improbable que exista una anomalía intrínseca del hematíe.
2. Si la hemólisis anómala se corrige completamente con la glucosa, es improbable que exista una anomalía me-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

tabólica y es probable que exista una anomalía de la membrana.
3. Si la hemólisis anómala no se corrige o lo hace en poca medida con la glucosa, es probable que haya una anomalía metabólica, siempre que no se observen las características obvias de la esferocitosis en la extensión sanguínea.

Por tanto, según nuestra experiencia, la combinación de la morfología eritrocitaria con los resultados de las pruebas de autohemólisis posibilita la diferenciación entre las anomalías de membrana y las deficiencias enzimáticas en la gran mayoría de los casos.

ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA

Las alteraciones de las proteínas de la membrana eritrocitaria que constituyen el citoesqueleto se asocian con anemias hemolíticas congénitas acompañadas de rasgos morfológicos característicos. Generalmente, el análisis sólo es posible en los laboratorios de referencia. La electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecyl sulfato sódico (SDS) de las membranas servirá para identificar las alteraciones cualitativas y cuantitativas de las proteínas específicas. La densitometría de las bandas de proteína en el gel da un perfil general, mostrando la espectrina, la ankirina, la banda 3 (la proteína de transporte de aniones) y la proteína 4.2. Las variantes de la espectrina se pueden detectar tras una digestión limitada por la tripsina de la espectrina extraída de las membranas eritrocitarias; un aumento en el dímero de espectrina es indicativo de un tetrámero inestable, que conduce a una mayor susceptibilidad para la fragmentación eritrocitaria en la eliptocitosis hereditaria y en la piropoiquilocitosis hereditaria[18].

Las alteraciones en las proteínas de la membrana implicadas en las anemias hemolíticas hereditarias se enumeran en la tabla 10.3.

Tabla 10.3. Anemias hemolíticas asociadas con déficit de las proteínas de la membrana del hematíe[18]

Banda	Proteína	Anemia hemolítica
1	α Espectrina	EIH, EH, PPH
2	β Espectrina	EIH, EH
2,1	Ankirina	EH
3	Intercambiador de aniones	EH, OSA, ADCII
4,1	Proteína 4,1	EIH
4,2	Palidina	EH
7	Estomatina	EsH
PAS-1	Glucoforina A	ADCII
PAS-2	Glucoforina C	

ADCII, anemia diseritropoyética congénita tipo II; EH, esferocitosis hereditaria; EIH, eliptocitosis hereditaria; EsH, estomatocitosis hereditaria; OSA, ovalocitosis del sudeste asiático; PPH, piropoiquilocitosis hereditaria.

DETECCIÓN DEL DÉFICIT ENZIMÁTICO EN LAS ANEMIAS HEMOLÍTICAS HEREDITARIAS

Para la mayoría de los laboratorios de hematología es posible identificar el déficit enzimático de G6PD y de PK e indicar dónde subyace el probable defecto en los trastornos menos habituales. Probablemente, los laboratorios especializados aborden mejor la investigación detallada de las enzimas aberrantes y del metabolismo de las células anómalas. La relación completa de los métodos disponibles para el estudio del metabolismo eritrocitario se puede encontrar en *Beutler's Red Cell Metabolism, a Manual of Biochemical Methods*[19] y en las recomendaciones del ICSH[20].

Hay dos etapas en el diagnóstico de los déficits enzimáticos eritrocitarios: la primera son los procedimientos de detección y la segunda los análisis de las enzimas específicas. Los procedimientos de detección simples e inespecíficos como la fragilidad osmótica y las pruebas de autohemólisis, que ya hemos descrito, pueden indicar la presencia de un trastorno metabólico y, actualmente, disponemos de pruebas bioquímicas sencillas para demostrar si el trastorno radica en la ruta de las pentosas fosfato o en la de Embden–Meyerhof; estas etapas intermedias de la glucólisis se ilustran en la figura 10.4.

Estas investigaciones pueden ampliarse mediante la cuantificación de los principales metabolitos eritrocitarios, 2,3-DPG, ATP y GSH, que están presentes a concentraciones milimolares y que pueden ser analizados de forma adecuada mediante técnicas espectrométricas. El bloqueo metabólico en la ruta de Embden–Meyerhof se refleja de forma exacta por la medición de la concentración de los intermediarios glucolíticos con demostración de la acumulación de los metabolitos proximales y depleción de los metabolitos distales al paso defectuoso (fig. 10.4). Estos análisis, generalmente sólo practicables en laboratorios especializados, deben realizarse sobre extractos eritrocitarios desproteinizados inmediatamente tras la preparación.

Pruebas de detección del déficit de la G6PD y de otros déficits de la ruta de las pentosas fosfato

Se han detectado muchas variantes de la enzima eritrocitaria G6PD y los métodos utilizados para identificar esas variantes[21] se han estandarizado. Su herencia está ligada al sexo porque la enzima está controlada por un locus genético en el cromosoma X. Las variantes que tienen una actividad deficiente producen uno de los diversos tipos de trastornos clínicos. Las dos variantes más habituales son el tipo mediterráneo, que tiene una actividad muy baja y que puede conducir al favismo (es decir, la hemólisis intravascular aguda consecutiva a la ingestión de habas), y el tipo A encontrado en las poblaciones negras del oeste de África y de los Estados Unidos, que produce la sensibilización a la pri-

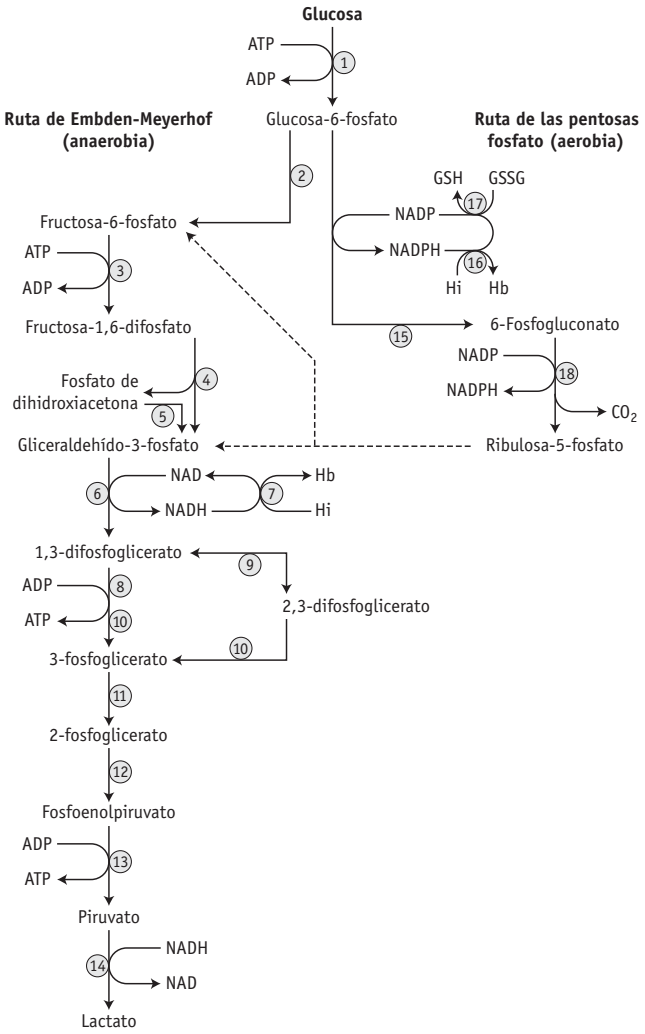


Figura 10.4. Representación esquemática de las rutas glucolíticas de los hematíes. Las enzimas se indican como sigue: 1: hexocinasa; 2: glucosafosfato isomerasa; 3: fosfofructocinasa; 4: aldolasa; 5: triosa fosfato isomerasa; 6: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; 7: NADH-metahemoglobina reductasa; 8: fosfogliceratocinasa; 9: difosfogliceromutasa; 10: difosfoglicerato fosfatasa; 11: fosfogliceromutasa; 12: enolasa; 13: piruvatocinasa; 14: lactato deshidrogenasa; 15: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; 16: NADPH-metahemoglobina reductasa; 17: glutatión reductasa; 18: 6-fosfogluconato deshidrogenasa. NADH, forma reducida del nicotina adenina dinucleótido; NADPH, forma reducida del nicotina adenina dinucleótido fosfato.

maquina. Ambos grupos son susceptibles de presentar hemólisis producida por fármacos oxidantes e infecciones.

La anemia hemolítica crónica no esferocítica es producida, con mucha menor frecuencia, por las variantes raras de la enzima. La ictericia neonatal grave con anemia se presenta en cerca del 5% de los pacientes con deficiencias importantes en la actividad enzimática.

El déficit de G6PD en los individuos hemicigóticos (hombre) u homocigóticos (mujer) puede distinguirse fácilmente mediante las pruebas de detección, aunque identificar a los portadores heterocigotos (mujeres) es más difícil.

Otros déficits de la ruta de las pentosas fosfato (v. pág. 186) producen también una deficiencia de la potencia reductora del hematíe. Los síndromes clínicos asociados con estos déficits incluyen la hemólisis intravascular, con o sin metahemoglobinemia, en respuesta a los fármacos oxidantes.

La G6PD cataliza la oxidación de la glucosa-6-fosfato (G6P) en 6-fosfogluconato (6PG) con la reducción simultánea de la nicotina adenina dinucleótido fosfato (NADP) a la NADP reducida (NADPH):

$$\text{G6P} + \text{NADP} \xrightarrow{\text{G6PD}} \text{6PG} + \text{NADPH}$$

En una segunda y consecutiva reacción, el 6PG se convierte en 6-fosfogluconolactona, con reducción de otra molécula de NADP a NADPH. A continuación, la lactona sufre una descarboxilación transformándose en ribulosa 5-fosfato mediante una reacción catalizada por una lactonasa específica, pero que puede ocurrir también de forma espontánea. Por tanto, la reacción global catalizada por la 6PG deshidrogenasa (6PGD) puede escribirse como sigue:

$$\text{6PG} + \text{NADP} \xrightarrow{\text{6PGD}} \text{Ru5P} + \text{CO}_2 + \text{NADPH}$$

La liberación de CO_2 desplaza la reacción hacia la derecha por lo que en la práctica la ruta no es reversible.

El NADPH es un componente reductor importante para la conversión del glutatión oxidado (GSSG) en GSH (v. fig. 10.4) y, en condiciones de estrés, la reconversión de Hi en Hb. Las pruebas de detección del déficit de G6PD se basan en la incapacidad de las células de los sujetos con la deficiencia para convertir un sustrato oxidado en un estado reducido. Los sustratos utilizados pueden ser el propio de la enzima, NADP, u otros sustratos producidos de forma natural y ligados por reacciones secundarias a la enzima: por ejemplo, GSSG, Hi o colorantes artificiales como el azul de metileno. La reacción se demuestra mediante fluorescencia[22], por el cambio de color cuando se utiliza un colorante[23] o por el depósito del colorante (p. ej., un anillo azul de formazán a partir del bromuro de difeniltetrazolio en presencia de metosulfato de fenazina)[24].

La prueba de detección utilizada en cada laboratorio concreto dependerá de diversos factores como el coste, el tiempo necesario, la temperatura, la humedad y la disponibilidad de los reactivos. Aquí se describen dos pruebas que se utilizan habitualmente y que son, por lo general, fiables.

Prueba de detección por fluorescencia del déficit de la G6PD

El método de la prueba de detección por fluorescencia del déficit de la G6PD es el de Beutler y Mitchell[22] modificado según las recomendaciones del ICSH[20].

Principio

La NADPH, generada por la G6PD presente en un lisado de células sanguíneas, fluoresce bajo la luz ultravioleta (UV)

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

de onda larga. En el déficit de G6PD, hay una incapacidad para producir suficiente NADPH, lo que origina una falta de fluorescencia.

Reactivos

D-glucosa-6-fosfato

10 mmol/l. Disolver 305 mg de la sal disódica, o una cantidad equivalente de la sal potásica, en 100 ml de agua.

$NADP^+$

7,5 mmol/l. Disolver 60 mg de $NADP^+$, sal disódica, en 10 ml de agua.

Saponina

750 mmol/l (10 g/l).

Tampón tris-HCl

pH 7,8. Véase la página 589.

Glutatión oxidado (GSSG) 8 mmol/l

Disolver 49 mg de GSSG en 10 ml de agua.

Mezclar los reactivos en las siguientes proporciones: 2 volúmenes de G6P, 1 volumen de $NADP^+$, 2 volúmenes de saponina, 3 volúmenes de tampón, 1 volumen de GSSG y 1 volumen de agua.

La mezcla reactiva es estable a –20 °C durante 2 o más años y durante al menos 2 meses si se mantiene a 4 °C. Se puede añadir azida para impedir el crecimiento de contaminantes sin pérdida de actividad. Verter volúmenes de 100 µl en tubos pequeños adecuados y mantenerlos a –20 °C listos para su uso.

Método

Descongelar los tubos suficientes para realizar la prueba y los controles. Dejar que el reactivo alcance la temperatura ambiente antes de su utilización.

Añadir 10 µl de sangre total, ya sea anticoagulada (EDTA, heparina, ACD [ácido-citrato-dextrosa] o CPD [citrato-fosfato-dextrosa]) o añadida antes de coagular, a los volúmenes de 100 µl de la mezcla de reactivos y mantenerlos a temperatura ambiente (15-25°C).

Aplicar 10 µl de la mezcla reactiva sobre un papel filtro Whatman del n.º 1 al comienzo de la reacción y de nuevo a los 5-10 min. A temperatura ambiente más elevada (25-30°C) puede ser adecuado un intervalo más corto. Dejar secar al aire completamente antes de examinar las manchas bajo la luz UV. Anotar si aparece fluorescencia (+) o no (–). Preparar siempre muestras de sangre normal y de sangre con déficit conocido de G6PD en paralelo.

Si se van a recoger las muestras fuera del laboratorio, colocar alrededor de 10 µl de sangre en el papel de filtro Whatman del n.º 1 y dejarlo secar. Recortar el disco de sangre seca en el laboratorio y añadirlo a la mezcla de reactivos. Siempre se debe hacer la prueba sobre una muestra de sangre normal como control positivo de fluorescencia (es decir, normal).

La prueba puede realizarse sobre sangre almacenada en ACD (siempre que sea estéril) hasta los 21 días a 4 °C y hasta los 5 días a temperatura ambiente.

Interpretación

La fluorescencia la produce el NADPH formado a partir del $NADP^+$ en presencia de la G6PD. Parte del NADPH producido se oxida por la acción de la GSSG, pero esta reacción, catalizada por la glutatión reductasa, suele ser más lenta que la tasa de producción de la NADPH. Los hematíes con menos del 20% de la actividad normal de G6PD no producen fluorescencia.

Como todas las pruebas de detección, este método es útil cuando se ha de probar una gran cantidad de muestras, pero los resultados deben ser interpretados con cuidado en los pacientes individuales. Las principales causas de interpretaciones erróneas son las siguientes:

1. *Falso-normal*. Si hay reticulocitosis, se puede observar una fluorescencia vívida en una muestra sanguínea con déficit genético de G6PD, porque los hematíes jóvenes tienen más actividad de la G6PD. Si la prueba se realiza durante un episodio de hemólisis aguda, se debe volver a analizar la sangre del paciente cuando el recuento reticulocitario haya regresado a la normalidad.
2. *Falso-déficit*. Si el paciente está anémico, se observará muy poca fluorescencia a pesar de que la G6PD sea genéticamente normal, simplemente porque hay relativamente pocos hematíes en los 10 µl de sangre utilizada.

Aunque es posible corregir una o ambas de estas contingencias, en caso de duda, es mejor proceder directamente con un análisis enzimático cuantitativo (explicado más adelante).

La prueba está diseñada para dar únicamente un resultado + o – (normal o déficit) por comparación con los controles y no tiene sentido graduar visualmente la intensidad de la fluorescencia. Si no disponemos de una muestra de control con déficit de G6PD, se puede utilizar como referencia el aspecto de la mancha en el «tiempo cero». Se puede calcular el umbral de un resultado «deficitario» haciendo diluciones de una muestra de sangre normal en solución salina y se establece mejor el grado de positividad al considerar como deficitaria la fluorescencia obtenida cuando la actividad de la G6PD es igual o inferior al 20% de la normal (lo que corresponde a una dilución 1:5 de sangre normal). Esto quiere decir que las variantes con una deficiencia muy leve y una proporción considerable de heterocigotos no podrán detectarse (v. pág. 189). Sin embargo, es improbable que ocurra una hemólisis clínicamente importante en sujetos que tienen más del 20% de actividad de la G6PD y, por tanto, éste parece ser un umbral apropiado (aunque arbitrario) para un diagnóstico de laboratorio. Ya que la prueba depende de la inspección visual, es mejor seleccionar el tiempo de incubación en relación con la temperatura ambiente en los ensayos preliminares. La producción de NADPH es un proceso acumulativo. Por tanto, dándole el tiempo suficiente, una muestra con déficit en G6PD terminará por fluorescer. El tiempo permitido para la reacción debería ser aquel en el que el contraste en la fluorescencia entre una muestra de sangre con G6PD normal y otra con déficit en G6PD fuera máximo.

PRUEBA DE REDUCCIÓN DE LA METAHEMOGLOBINA[23]

Principio

El nitrito sódico convierte la Hb en Hi. Cuando no se añade azul de metileno, la metahemoglobina se mantiene; sin embargo, la incubación de las muestras con azul de metileno permite la estimulación de la ruta de las pentosas fosfato en sujetos con valores normales de G6PD. La Hi se reduce durante el período de incubación. En los sujetos con déficit de G6PD, el bloqueo de la ruta de las pentosas fosfato evita esta reducción.

Reactivos

Nitrito sódico

180 mmol/l.

Dextrosa

280 mmol/l. Disolver 5 g de dextrosa AR y 1,25 g de $NaNO_2$ en 100 ml de agua.

Azul de metileno

0,4 mmol/l. Disolver 150 mg de cloruro de metiltionina (cloruro de azul de metileno, Sigma) en 1 l de agua.

Sulfato azul de Nilo

22 mg en 100 ml de agua. Puede utilizarse como alternativa al azul de metileno.

Los reactivos pueden utilizarse de diferentes formas para ajustarse a las necesidades de cada laboratorio. Hay que preparar un lote de tubos antes de su utilización mezclando volúmenes iguales de los reactivos (nitrito sódico con azul de metileno o con sulfato azul de Nilo) y pipeteando 0,2 ml de los reactivos combinados en tubos de vidrio individuales. Hay que utilizar tubos de vidrio porque el plástico puede absorber alguno de los reactivos. Se deja evaporar el contenido de los tubos hasta que se sequen a temperatura ambiente (15-25 °C) o en un horno a una temperatura que no exceda los 37 °C. A continuación se deben cerrar los tubos herméticamente. El reactivo se mantendrá durante 6 meses a temperatura ambiente. No obstante, se pueden utilizar reactivos frescos, sin secar.

Método

Utilizar sangre anticoagulada (EDTA o ACD) y analizar las muestras preferiblemente antes de 1 h de su recogida si se han dejado en la gradilla o antes de 6 h si se han conservado a 4 °C. La sangre en ACD puede, no obstante, almacenarse hasta 1 semana pero no será satisfactoria si hay algún grado de hemólisis. En la sangre de pacientes con anemia grave, ajustar el Hto a 0,40 ± 0,05.

Añadir 2 ml de sangre al tubo que contiene 0,2 ml de la mezcla reactiva, ya sean desecados o recién preparados. Tapar el tubo y mezclar suavemente el contenido invirtiéndolo 15 veces.

Preparar los tubos de control añadiendo 2 ml de sangre a un tubo similar sin reactivos (tubo de referencia normal) y a un tubo que contenga 0,1 ml de una mezcla de nitrito sódico-dextrosa sin azul de metileno (tubo de referencia «deficitario»).

Incubar las muestras a 37 °C durante 90 min. Si la sangre se ha heparinizado, se debe mantener la incubación durante 3 h. Tras la incubación, pipetear volúmenes de 0,1 ml de la muestra problema, del tubo de referencia normal y del tubo de referencia deficitario en 10 ml de agua en tubos de ensayo de vidrio transparente, separados y de idéntico diámetro. Mezclar suavemente los contenidos. Comparar los colores en los distintos tubos (v. la siguiente sección).

Interpretación

La sangre normal presenta un color similar a la del tubo de referencia normal (es decir, un rojo claro). La sangre de los sujetos con déficit da un color marrón similar al del tubo de referencia deficitario. Los heterocigotos dan reacciones intermedias.

Aunque este método es más lento que la prueba de la fluorescencia, tiene las ventajas de que es extremadamente barato y de que el único equipamiento requerido es un baño María. Además, la prueba puede complementarse con un análisis citoquímico que permite en sí mismo detectar el déficit de G6PD en pacientes con reticulocitosis y en los heterocigotos.

Detección de los heterocigotos en el déficit de G6PD

Las mujeres heterocigotas para el déficit de G6PD tienen dos poblaciones de células: una con una actividad G6PD normal y la otra con una actividad G6PD deficiente. Éste es el resultado de la inactivación de uno de los dos cromosomas X en las células individuales al comienzo del desarrollo embrionario. Todas las células de la progenie (es decir, las células somáticas) en las mujeres tendrán únicamente las características del cromosoma X activo[25]. La actividad total de la G6PD en la sangre de la mujer dependerá de la proporción de las células deficitarias con respecto a las normales. En la mayoría de los casos, la actividad se situará entre el 20 y el 80% de la normal. Sin embargo, algunos heterocigotos (alrededor del 1%) pueden tener casi todas las células normales o casi todas las células con déficit de G6PD.

Las pruebas de detección para el déficit de G6PD no pueden identificar la mayoría de los heterocigotos. Sin embargo, se pueden identificar los hematíes deficitarios en las extensiones sanguíneas mediante un procedimiento de elución (v. la siguiente sección).

Equipos comerciales

Se dispone de diversos equipos comerciales para la detección del déficit de G6PD. En el mercado existe una prueba de fluorescencia en la mancha (anteriormente Sigma 103) y una prueba basada en la reducción del colorante dicloroindofenol a un estado incoloro en presencia de metosulfato de fenazina (anteriormente Sigma 400)[a].

[a] Trinity Biotech, Oxford X14 4TF; véase la lista de productos en su página web.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

El equipo Quantase[b] es un método fotométrico para utilizar en sangre total o en manchas de sangre seca; la NADPH producida por la oxidación de G6P a 6PG se mide por el aumento en la absorción a 340 nm.

Cada prueba o lote de pruebas debe incluir una muestra normal y otra con déficit de G6PD. La sangre de oveja es una fuente aprovechable de sangre con deficiencia natural. Siempre que sea posible, es recomendable la participación en un programa de control externo de la calidad (o ensayo de aptitud) (v. pág. 571).

PRUEBAS CITOQUÍMICAS PARA DEMOSTRAR LOS DÉFICITS EN EL METABOLISMO DE LOS HEMATÍES

Existen métodos citoquímicos por medio de los cuales se pueden demostrar algunos de estos déficits en las células individuales. Así, se han descrito pruebas para poner de manifiesto a los hematíes con déficit de G6PD[26-28]. El principio en que se basan estos métodos es el tratamiento de los hematíes con nitrito sódico para convertir su oxihemoglobina (HbO_2) en metahemoglobina (Hi). En presencia de G6PD, la Hi se reconvierte en HbO_2, pero en el déficit de G6PD, la Hi persiste. A continuación se incuba la sangre con un compuesto de tetrazolio soluble (MTT), que será reducido por la HbO_2 (pero no por la Hi) originando una estructura de formazán insoluble.

Se han hecho intentos para mejorar la fiabilidad de la prueba en la detección de los heterocigotos (p. ej., por fijación ligera controlada de los hematíes y aceleración de la reacción con un portador exógeno de electrones [1- metoxifenazina meto-sulfato])[29]. Estos procedimientos citoquímicos no tienen más sensibilidad para la demostración del déficit de G6PD que las sencillas pruebas de detección descritas más arriba. Sin embargo, pueden ser útiles para los estudios genéticos y para valorar la actividad de la G6PD en las mujeres[30]; pueden ser la única forma de detectar la deficiencia en el estado heterocigoto.

Demostración de las células con déficit de G6PD

Reactivos

Nitrito sódico

0,18 mol/l (12,5 g/l). Se debe almacenar la solución en una botella oscura y prepararla mensualmente.

Medio de incubación

4 ml de NaCl 9 g/l; 1,0 ml de glucosa 50 g/l; 2,0 ml de tampón fosfato 0,3 mol/l pH 7,0; 1,0 ml de sulfato azul de Nilo 0,11 g/l; 2,0 ml de agua.

MTT tetrazolio

5 g/l de bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazolil-1-2)-2,5 difeniltetrazolio en NaCl 9 g/l.

[b] Quantase Ltd., Cumbernauld, Escocia.

Solución salina hipotónica

NaCl 6 g/l.

Método[26]

Utilizar sangre venosa recogida en ACD. La prueba debe realizarse antes de las 8 h de la extracción, manteniendo la sangre a 4 °C hasta que sea analizada. Centrifugar la sangre a 4 °C durante 20 min a 1.200-1.500 g.

Desechar el sobrenadante y añadir 0,5 ml de concentrado de hematíes a 9 ml de NaCl, 9 g/l y a 0,5 ml de solución de nitrito sódico contenidos en un tubo de vidrio de centrífuga de 15 ml. Incubar a 37 °C durante 20 min. Centrifugar a 4 °C durante 15 min a, aproximadamente, 500 g; a continuación desechar el líquido sobrenadante sin alterar la capa de leucocitos y la capa superior de hematíes. Lavar las células tres veces con solución salina fría. Tras el último lavado, eliminar la capa de leucocitos, mezclar bien el concentrado de células y transferir 50 ml a un tubo de vidrio que contenga 1 ml del medio de incubación. Incubar la suspensión sin perturbaciones a 37 °C durante 30 min. Después añadir 0,2 ml de la solución con MTT, agitar suavemente e incubar a 37 °C durante 1 h. Volver a dejar completamente las células en suspensión. Colocar una gota adyacente a otra gota de solución salina hipotónica en un portaobjetos de vidrio, mezclar concienzudamente las gotas y cubrirlas con un cubreobjetos.

Examinar los hematíes con un objetivo de inmersión y, además, registrar la presencia de los gránulos de formazán (fig. 10.5).

Interpretación

Cuando la actividad de la G6PD es normal, se tiñen todos los hematíes. En los hemicigóticos para la G6PD, la mayoría de los hematíes quedan sin teñir. En los heterocigotos, se observa habitualmente un mosaico; por lo general, del 40 al 60% de las células no se tiñen, por lo que la proporción puede ser mucho menor, y en los casos extremos solamente un 2-3% pueden quedarse sin teñir.

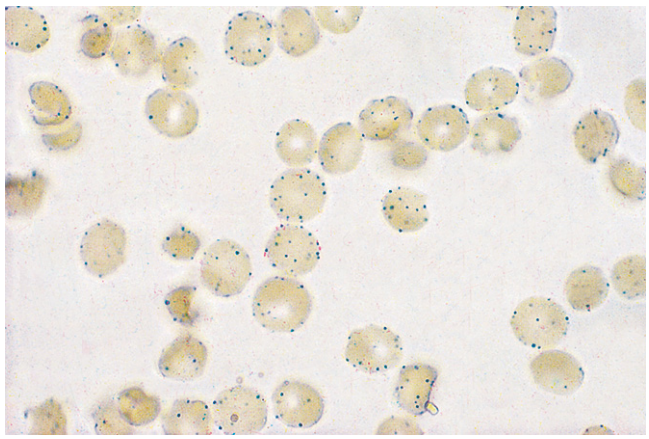


Figura 10.5. Demostración citoquímica de la G6PD (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa). Sangre normal; reacción positiva con gránulos de formazán en los hematíes.

PRUEBAS DE DETECCIÓN DE LA PIRIMIDINA-5'-NUCLEOTIDASA

Valentine y cols.[31] describieron por primera vez la pirimidina-5'-nucleotidasa (P5N) como una enzima citosólica en los hematíes humanos. El déficit de P5N-1 (uridina monofosfato hidrolasa-1), que muestra una herencia autosómica recesiva, está relacionado con la anemia hemolítica congénita. Los heterocigotos son clínica y hematológicamente normales y tienen, de forma característica, cerca de la mitad de la actividad de la P5N de los hematíes normales. El déficit homocigótico de la P5N, en el que la actividad de la enzima es generalmente de un 5 a un 15% de la normal, se traduce en una anemia hemolítica crónica no esferocítica, que se caracteriza por una hemólisis de leve a moderada, un punteado basófilo marcado visible en hasta el 5% de los hematíes y un aumento notable tanto en el glutatión como en los nucleótidos de la pirimidina de los hematíes. La fragilidad osmótica es normal. La tasa de autohemólisis está aumentada con poca o ninguna reducción de la lisis al añadirle glucosa[6].

El déficit de P5N parece ser una causa relativamente infrecuente de anemia hemolítica hereditaria no esferocítica. Dado que el plomo es un inhibidor de la P5N, en la intoxicación por el plomo se produce un déficit adquirido, lo cual puede ser importante en la patogenia de la anemia asociada. La prueba diagnóstica final es un análisis cuantitativo de la actividad de la P5N; no obstante, el hallazgo de valores supranormales de nucleótidos en los hematíes (principalmente pirimidinas) es muy sugestivo y puede utilizarse para la detección del déficit.

La actividad de la P5N puede medirse con un método colorimétrico[31] o radiométrico[32]. Para la detección de la deficiencia de P5N, el método recomendado por el ICSH es la determinación del espectro UV de un extracto sanguíneo[33].

Principio

El conjunto de nucleótidos en los hematíes normales consiste fundamentalmente (>96%) en derivados de la purina (adenina y pequeñas cantidades de guanina). Los niveles de citidina y de uridina son, por lo general, extremadamente bajos. Sin embargo, en las células con déficit de P5N, más del 50% de este depósito está formado por nucleótidos de pirimidina.

En las soluciones ácidas, los nucleótidos de citidina tienen una absorbancia máxima a aproximadamente 280 nm, mientras que la absorbancia máxima de los nucleótidos de adenina, guanina y uridina se sitúa en los 260 nm. La tasa de absorbancia a 260 nm en relación con la absorbancia a 280 nm refleja la abundancia relativa de nucleótidos de citidina; la tasa de absorbancia es inferior cuando hay mayor cantidad de derivados de la pirimidina.

Reactivos

Solución de cloruro sódico

NaCl 9 g/l.

Ácido perclórico

Al 4%. 28,6 ml de una solución de ácido perclórico al 70% se diluyen en agua hasta un volumen final de 500 ml.

Tampón glicina

7,51 g de glicina 1 mol/l a pH 3,0 se disuelven en aproximadamente 80 ml de agua; el pH se ajusta a 3,0 con ácido clorhídrico concentrado (HCl) y se añade agua a la solución hasta un volumen final de 100 ml.

Método[33]

Para la preparación de la muestra, hay que centrifugar la sangre recién recogida en EDTA a 1.200 g durante 5 min, eliminar el plasma y lavar las células tres veces con una solución de NaCl ,9 g/l, mantenida en hielo fundente. Añadir 1 ml de una suspensión al 50% de los hematíes lavados a 4 ml de una solución de ácido perclórico (APC) al 4% mantenida en hielo fundente y agitarla vigorosamente durante 30 s. Transferir el sobrenadante claro obtenido tras la centrifugación a 1.200 g durante 15 min a un tubo de ensayo pequeño. Preparar un extracto falso añadiendo 1 ml de NaCl 9 g/l a 4 ml de de una solución de APC al 4%.

Añadir 500 µl de agua y 300 µl de tampón de glicina 1 mol/l a cada una de las dos cubetas. Para corregir las diferencias ópticas entre los tubos, leer el tubo de muestra contra el blanco a 260 y a 280 nm, dando las lecturas B^{260} y B^{280}. Añadir 200 µl del extracto eritrocitario a la cubeta para la muestra y 200 µl del extracto falso a la cubeta para el blanco. Poner el cero en el espectrómetro a los 260 nm con la cubeta del blanco, leer la cubeta de la muestra para obtener el valor S^{260}. Repetir el proceso a 280 nm para obtener la lectura S^{280}.

La tasa de absorbancia (R) A^{260}/A^{280} se calcula restando las lecturas del tubo blanco (positivas o negativas) a los 260 y a los 280 nm de las lecturas obtenidas en el extracto eritrocitario cuando se las utiliza como blanco contra el extracto falso:

$$R = \frac{S^{260} - B^{260}}{S^{280} - B^{280}}$$

Interpretación

Se ha notificado que la tasa de absorbancia A^{260}/A^{280} de los hematíes lavados recién extraídos es de 3,11 ± 0,41 (media ± DE). Las tasas de absorbancia inferiores a 2,29 implican que la concentración de nucleótido de citidina está aumentada y sugieren un valor reducido de P5N. Se ha notificado una acumulación selectiva de las pirimidinas, debido a un supuesto defecto en la CDP colina fosfotransferasa, en algunos pacientes que sufren un trastorno que recuerda al déficit de P5N, caracterizado por anemia hemolítica y punteado basófilo.

Hay que realizar un análisis específico de la P5N en aquellas muestras que presentan una tasa de absorbancia significativamente reducida[34]. Es probable que precisen la remisión a un laboratorio de referencia donde también se pueda llevar a cabo un perfil de nucleótidos. Se puede realizar una extracción de nucleótidos seguida del radiomarcado y de la separación por cromatografía en fase líquida

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

de alta resolución. Los nucleótidos tienen espectros de absorción de UV y tiempos de retención característicos, lo que permite su radiodetección y la cuantificación posterior.

ANÁLISIS DE LAS ENZIMAS ERITROCITARIAS

Como se ilustra en la figura 10.4, hay un gran número de enzimas que desempeñan un papel importante en el metabolismo de la glucosa en los hematíes y se sabe que existen variantes genéticamente determinadas de casi todas las enzimas. Esto significa que, al investigar a un paciente con sospecha de anemia hemolítica hereditaria por déficit enzimático, puede ser necesario analizar múltiples enzimas para identificar el defecto. Sin embargo, en la práctica hay que excluir en primer lugar el déficit de G6PD y de PK por la relativa frecuencia (habitual en el caso de la G6PD y frecuente en el caso de la PK) con que las variantes de estas enzimas se relacionan con una actividad deficitaria y un aumento de la hemólisis.

Disponemos de muchos métodos para analizar cada enzima y, por esta razón, el ICSH ha generado métodos simplificados adecuados para fines diagnósticos[35]. Estos métodos no son necesariamente los más apropiados para un estudio detallado de las propiedades cinéticas de las variantes enzimáticas, pero son relativamente sencillos de poner en marcha y permiten la comparación de los resultados entre los diferentes laboratorios.

Puntos generales de la técnica

Recogida de las muestras sanguíneas

Las muestras sanguíneas pueden anticoagularse con heparina (10 UI/ml de sangre), EDTA (1,5 mg/ml de sangre) o ACD (para las fórmulas y los volúmenes v. pág. 587). Con cualquiera de estos anticoagulantes, todas las enzimas normales son estables durante 6 días (y la mayoría durante 20 días) a 4 °C y durante 24 h a 25 °C. Sin embargo, las variantes enzimáticas de las muestras de los pacientes pueden ser menos estables. Por tanto, recomendamos que se utilice el ACD como anticoagulante y que se hagan cuanto antes las pruebas sobre las muestras. La forma ideal de transferir las muestras de sangre a los laboratorios centrales es en tubos rodeados de hielo húmedo a 4 °C. Las muestras congeladas no resultan adecuadas porque las células se lisan con la congelación. Beutler nos ha dado amplios detalles sobre la estabilidad de las enzimas[19]. Aproximadamente se requiere 1 ml de sangre para cada análisis enzimático.

Separación de los hematíes de las muestras sanguíneas

Los leucocitos y las plaquetas tienen generalmente actividades enzimáticas mayores que los hematíes. Además, en muchas deficiencias enzimáticas, sobre todo en el déficit de PK, la reducción en la actividad enzimática puede ser mucho menos pronunciada en los leucocitos y en las plaquetas que en los hematíes, o puede incluso ser normal. Por tanto, es necesario preparar los hematíes de manera que se hallen tan libres de contaminantes como sea posible. Hay diversos métodos que son adecuados (v. ICSH[35]); a continuación se describen dos de ellos.

Lavado de los hematíes

Centrifugar la sangre anticoagulada a 1.200-1.500 g durante 5 min y eliminar el plasma junto con la capa de leucocitos.

Volver a suspender las células en NaCl 9 g/l (solución salina) y repetir el procedimiento tres veces. Así se eliminarán cerca del 80-90% de los leucocitos.

Este sencillo método es adecuado en la mayoría de los casos cuando no es práctico realizar maniobras más complicadas, pero tiene la desventaja de que algunos de los reticulocitos y los hematíes jóvenes se pierden juntamente con la capa de leucocitos. Además, puede que los leucocitos restantes sean aún suficientes para causar resultados engañosos: por ejemplo, en el déficit de PK. Por tanto, lo ideal es adoptar el siguiente método.

Filtrado a través de mezclas de celulosa microcristalina

Se pueden preparar suspensiones de hematíes puros a partir de sangre total filtrando la sangre con un lecho mixto de celulosa microcristalina (tamaño medio 50 μm) y α-celulosa. Mezclar aproximadamente 0,5 g de cada tipo de celulosa con 20 ml de solución salina helada; así se obtiene una suspensión suficiente para 3-5 columnas. Como columna se utiliza el barril de una jeringa de 5 ml. La salida de la jeringa se bloquea con algodón hidrófilo absorbente, con un volumen igual a la marca de 1 ml en el barril. Verter la suspensión, tras agitarla bien, en la columna hasta obtener un lecho con un volumen de 1-2 ml después de que la solución salina lo haya atravesado. Lavar el lecho con 5 ml de solución salina para eliminar cualquier «partícula menuda». Cuando la solución salina haya pasado, pipetear 1-2 ml de sangre total sobre la columna, cuidando de no alterar el lecho. Recoger el filtrado y, una vez que la sangre haya atravesado completamente el lecho, lavar la columna dejando pasar a su través 5-7 ml de solución salina. La columna debe hacerse de nuevo para cada lote de análisis enzimático y debe utilizarse lo antes posible una vez preparada.

Con este método, se eliminan cerca del 99% de los leucocitos y del 90% de las plaquetas. Se recuperan alrededor del 97% de los hematíes y no hay eliminación selectiva de los reticulocitos. El procedimiento no debe alterar la edad ni el tamaño de la distribución de los hematíes recuperados en comparación con la sangre original. Hay que comprobar este aspecto con cada nuevo lote de celulosa por medio del recuento de reticulocitos.

Lavar las células recogidas de la columna dos veces en 10 volúmenes de solución salina helada y, por último, volver a suspenderlas en la solución salina hasta obtener una suspensión del 50%.

Determinar la Hb y/o el recuento eritrocitario en una muestra de la suspensión.

Preparación del hemolizado

Mezclar 1 volumen de la suspensión lavada o filtrada con 9 volúmenes de la solución lisante consistente en EDTA

2,7 mmol/l a pH 7,0 y 2-mercaptoetanol 0,7 mmol/l (100 mg de sal disódica de EDTA y 5 µl de 2-mercaptoetanol en 100 ml de agua); ajustar el pH a 7,0 con HCl o con NaOH.

Asegurar la lisis completa mediante la congelación-descongelación. La congelación rápida se consigue utilizando un baño de acetona enfriada con hielo seco o con metanol que haya sido previamente enfriado a –20 °C. La descongelación se consigue en un baño de agua a 25 °C o simplemente con el agua a temperatura ambiente. Por lo general, el hemolizado está listo para su uso sin una centrifugación posterior, aunque se recomienda centrifugarlo durante 1 min en una microcentrífuga para eliminar cualquier turbidez (puede que esto no sea adecuado para algunas enzimas eritrocitarias que estén fijadas a la estroma). Cuando sea necesario, las diluciones se realizarán en la solución lisante. El hemolizado debe prepararse de nuevo para cada lote de análisis enzimático. La mayoría de las enzimas en los hemolizados son estables durante 8 h a 0 °C, pero es mejor realizar los análisis inmediatamente. La G6PD es una de las enzimas menos estables en este hemolizado y su análisis debe realizarse antes de que transcurran 1 o 2 h desde la preparación del lisado. No se recomienda el almacenamiento de las células o de los hemolizados congelados; es preferible almacenar la sangre total en ACD.

Muestras de control

Hay que analizar siempre las muestras de control al mismo tiempo que las muestras problema incluso aunque se haya establecido un intervalo de normalidad para las diversas enzimas.

Obtener las muestras de sangre de control en el mismo momento que las muestras que se van a estudiar y tratarlas de la misma forma. Cuando se reciban las muestras de fuentes exteriores, pedir siempre que se incluya un «control» normal.

Tampón de reacción

El ICSH recomienda un tampón de Tris-HCl/EDTA que sea adecuado para todos los análisis enzimáticos habituales. El tampón consiste en Tris-HCl 1 mol/l y Na_2EDTA 5 mmol/l; el pH se ajustará a 8,0 con HCl.

Disolver 12,11 g de Tris (hidroximetil) metilamina y 168 mg de Na_2 EDTA en agua; ajustar el pH a 8,0 con HCl 1 mol/l y aumentar el volumen hasta los 100 ml a 25 °C.

Sólo describiremos dos análisis en detalle: el de G6PD y el de PK. Sin embargo, los principios de estos análisis son aplicables al resto de los análisis enzimáticos. Los análisis se realizan con un espectrómetro a una longitud de onda de 340 nm a menos que se indique lo contrario. Una mezcla de la reacción final de 1,0 ml (o 3,0 ml) resulta adecuada; las cantidades que se dan en el texto son para mezclas reactivas de 1,0 ml, a menos que se indique lo contrario. Todas las diluciones de las enzimas auxiliares se hacen en la solución lisante y todos los materiales operativos deben conservarse en un baño de hielo hasta que estén listos para su uso. Los análisis se realizan a temperatura controlada, siendo la más adecuada de 30 °C. Los tubos cargados con los reactivos de los análisis deben preincubarse a esta temperatura durante 10 min antes de comenzar la reacción. En la mayoría de los casos, la reacción empieza con la adición del sustrato. Muchos espectrómetros tienen un registro incorporado o adjunto, con el que se pueden medir de manera adecuada los cambios en la absorbancia. Si no se dispone de un registro, se deben hacer lecturas visuales cada 60 s. En cualquier caso, se ha de seguir la reacción durante 5-10 min y es esencial asegurar que, durante este intervalo, el cambio en la absorbancia sea lineal con el tiempo.

Tabla 10.4. Análisis de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

Reactivos	Análisis (ml)	Blanco (ml)
Tampón Tris-HCl EDTA, pH 8,0	100	100
$MgCl_2$, 100 mmol/l	100	100
NADP, 2 mmol/l	100	100
Hemolizado 1:20	20	20
Agua	580	680
Comenzar la reacción añadiendo: G6P, 6 mmol/l	100	–

EDTA, ácido etilendiaminotetraacético; NADP, G6P, glucosa-6-fosfato.

Análisis de la G6PD

Ya hemos descrito las reacciones relacionadas con la G6PD (v. pág. 186). La actividad de la enzima se analiza siguiendo la tasa de producción de NADPH, que, a diferencia del NADP, tiene un pico de absorción de la luz UV a 340 nm.

Método

Los análisis se realizan a 30 °C; los tubos que contienen los primeros cuatro reactivos y el agua se incuban durante 10 min antes de comenzar la reacción con la adición del sustrato, como se muestra en la tabla 10.4. En el mercado existen equipos comercializados con este fin[c].

El cambio en la absorbancia consecutivo a la adición del sustrato se mide durante los primeros 5 min de la reacción. El valor del blanco se sustrae de la reacción en curso, ya sea de forma automática o mediante cálculos.

Cálculo de la actividad enzimática

Las actividades de las enzimas en el hemolizado se calculan a partir de la tasa inicial del cambio en la acumulación de NADPH:

$$\text{Actividad de la G6PD en el lisado (en mol/ml)} = \Delta\ \text{A/min} \times \frac{10^3}{6{,}22}$$

donde 6,22 es el coeficiente de extinción en milimoles de NADPH a 340 nm, y 10^3 es el factor adecuado para las di-

[c] Trinity Biotech, OX14 4TF.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

luciones en la mezcla reactiva. Los resultados se expresan por 10^{10} hematíes, por mililitro de hematíes o por gramo de Hb en referencia a los valores respectivos obtenidos con la suspensión de hematíes lavados. Sin embargo, la recomendación del ICSH es expresar los valores por gramo de Hb y lo ideal es determinar la concentración de Hb del hemolizado directamente. Para hacerlo, hay que utilizar el hemolizado y la solución de Drabkin en proporción de 1:25.

La G6PD es muy estable y, en la mayoría de las variantes, se puede almacenar la sangre venosa en ACD hasta 3 semanas a 4 °C sin pérdida de actividad.

Algunas variantes con deficiencia enzimática pierden la actividad más rápidamente y esto hará que el déficit parezca más grave de lo que es en realidad. Por lo tanto, con fines diagnósticos, el retraso en analizar las muestras bien conservadas no debe ser un freno.

Valores normales

El intervalo normal de actividad de la G6PD debe determinarlo cada laboratorio. Si se utiliza el método del ICSH, los valores no deben diferir mucho de los valores dados. Los resultados se expresan en unidades de enzima (ue)[d], que son los micromoles de sustrato convertido por minuto.

En los adultos, estos valores son 8,83 ± 1,59 ue/g de Hb a 30 °C. Sin embargo, los recién nacidos y los lactantes pueden tener una actividad enzimática que se aparta de forma notable de los valores adultos[35,36]. En un estudio, la actividad media de los recién nacidos estaba alrededor del 150% de la media de los adultos[37].

Interpretación de los resultados

Al valorar la importancia clínica del análisis de la G6PD, se deben tener en cuenta tres hechos importantes:

1. El gen de la G6PD se sitúa en el cromosoma X y por tanto los hombres, que sólo tienen un gen para la G6PD, pueden ser únicamente hemicigotos normales o deficitarios. En cambio, las mujeres, que tienen dos genes alelos, pueden ser homocigotas normales, heterocigotas con actividad enzimática «intermedia» u homocigotas con deficiencia.
2. Los hematíes pueden sufrir una hemólisis debida a la deficiencia de G6PD únicamente si tienen menos del 20% de la actividad enzimática normal.
3. La actividad de la G6PD disminuye notablemente a medida que los hematíes envejecen. Por tanto, cuando una muestra de sangre tiene una población de hematíes jóvenes, la actividad de la G6PD será superior a lo normal, a veces hasta el punto de que una muestra genéticamente deficiente puede presentar valores dentro del intervalo de normalidad. Esto se asocia habitualmente, aunque no siempre, con una reticulocitosis elevada.

En la práctica, pueden ser de utilidad las observaciones siguientes:

1. En los hombres, el diagnóstico no presenta dificultades en la mayoría de los casos porque la separación entre los sujetos normales y los deficitarios está bien definida. Hay muy pocas situaciones adquiridas en las que se presente una reducción de la actividad de la G6PD (una es la aplasia eritrocitaria pura, donde existe reticulocitopenia), mientras que en todas las situaciones hemolíticas agudas y crónicas con reticulocitosis se encuentra aumento de la actividad G6PD. Por tanto, un valor de G6PD inferior al intervalo normal establecido indica siempre una deficiencia de G6PD. Un valor en el intervalo bajo-normal en presencia de reticulocitosis debe siempre hacernos sospechar la existencia de una deficiencia de G6PD porque en la reticulocitosis la actividad de la G6PD debe ser *superior* a lo normal. En tales casos de sospecha, el déficit de G6PD puede confirmarse repitiendo el análisis cuando la reticulocitosis haya remitido, analizando los hematíes más maduros tras un fraccionamiento por densidad o realizando estudios familiares.
2. En las mujeres son aplicables los mismos criterios, con la consideración añadida de que nunca se puede descartar de manera rigurosa la heterocigosidad mediante un análisis de la G6PD; con este fin, la prueba citoquímica descrita en la página 190 es más útil que un análisis espectrométrico y la recomendación idónea es utilizar ambos conjuntamente, además de los estudios familiares. Sin embargo, en la mayoría de los casos, un valor normal en una mujer significa que es una homocigota normal, mientras que un valor inferior al 10% de la normalidad significa que es una homocigota con deficiencia (tabla 10.5); no obstante, unas cuantas heterocigotas pueden caer en cualquiera de estos intervalos debido a los «fenotipos extremos» que pueden estar relacionados con una tasa desequilibrada del mosaicismo consecutivo a la inactivación del cromosoma X. Cualquier valor entre el 10 y el 90% de lo normal corresponde habitualmente a un heterocigoto, sin tener en cuenta el efecto de la reticulocitosis, que supone una complicación. En lo que concierne a la importancia clínica de la heterocigosidad para el déficit de G6PD, es importante recordar que, por causa del mosaicismo, una fracción de los hematíes en los heterocigotos (de media un 50%) tiene tanta deficiencia enzimática como un hombre hemicigoto y es por tanto susceptible de presentar hemólisis. La gravedad de las complicaciones clínicas potenciales es, en líneas generales, proporcional a la fracción de hematíes con deficiencia. Por tanto, dentro del intervalo heterocigoto, el valor real del análisis (o la proporción de hematíes deficitarios calculada por la prueba citoquímica) se correlaciona con el riesgo de hemólisis. Durante un episodio agudo puede que no se detecte a los heterocigotos si sus hematíes con deficiencia han sufrido una hemólisis, dejando, así, únicamente a la población normal en la circulación. Esto puede ocurrir antes de que la respuesta de los hematíes se haga evidente y dar como resultado una actividad de la G6PD dentro del intervalo de normalidad.

[d] Unidades enzimáticas.

Tabla 10.5. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en diversas situaciones clínicas (actividad en unidades enzimáticas [ue] por g de hemoglobina)

Genotipos masculinos	Gd^+	Gd^-	
Genotipos femeninos	**Gd^+/Gd^+**	**Gd^-/Gd^-**	**Gd^+/Gd^-**
En el sujeto sano	7-10	<2	2-7
En el aumento de hemólisis no relacionado con la deficiencia de G6PD	15	4	4-9
Durante la recuperación de una anemia relacionada con la G6PD	–	6,5	6-10

G6PD, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
Los valores mencionados son ejemplos.
Gd^+ designa al alelo que codifica a la G6PD normal; *Gd^-* designa al alelo que codifica a una variante asociada con el déficit de G6PD.

Identificación de las variantes de la G6PD

Existen muchas variantes de la G6PD en poblaciones diferentes, con actividades enzimáticas que van desde cerca del 0 hasta el 500% de la actividad normal (v. los detalles completos en la referencia bibliográfica 38). La clasificación y la identificación provisional de las variantes se basan en sus características fisicoquímicas y enzimáticas[39]. Los criterios de los requisitos mínimos para la identificación de tales variantes fueron determinados por un grupo científico de la OMS[21] y esas recomendaciones se han revisado recientemente[40]. Las pruebas se realizan en los hombres hemicigotos y son las siguientes:

- Actividad de la G6PD eritrocitaria.
- Migración electroforética.
- Constante de Michaelis (K_m) para la G6PD.
- Tasa relativa de utilización de la 2-desoxiG6P (2dG6P).
- Estabilidad térmica.

Se ha establecido la secuencia completa de aminoácidos de la G6PD y la identificación definitiva puede hacerse por análisis secuencial a nivel del ADN[41,42]. El diagnóstico de la deficiencia de G6PD por análisis molecular puede ser clínicamente útil cuando el paciente ha recibido una gran cantidad de sangre en transfusión o cuando una reticulocitosis presenta un nivel de análisis enzimático normal; también, se pueden identificar rápidamente a las mujeres heterocigotas con deficiencia (v. cap. 21).

ANÁLISIS DE LA PIRUVATOCINASA

Muchas variantes de PK tienen una actividad enzimática deficitaria *in vivo*[43,44]. En la mayoría de los casos, la actividad deficiente puede identificarse mediante un sencillo análisis enzimático. Sin embargo, la actividad de la PK en los hematíes está sujeta a regulación por diversas moléculas efectoras. En algunas variantes de la PK, la velocidad máxima (V_{max}) de la enzima es normal o casi normal, pero con las bajas concentraciones de sustrato encontradas *in vivo*, la actividad de la PK puede ser lo suficientemente baja para causar una hemólisis, ya sea porque la afinidad por los sustratos, fosfoenolpiruvato (FEP) y ADP, sea baja o porque la unión del importante ligando alostérico, fructosa-1,6-difosfato, esté alterada. Algunas de estas variantes inusuales pueden identificarse realizando el análisis enzimático, no sólo bajo condiciones estándar sino también con bajas concentraciones de sustrato. La deficiencia funcional de PK puede también identificarse con el hallazgo de concentraciones elevadas de los sustratos inmediatamente por encima del bloqueo en la ruta glucolítica, sobre todo el 2,3-DPG[45]. (Para la medición del 2,3-DPG, v. pág. 198).

La deficiencia de PK se hereda como un trastorno autosómico recesivo.

Método

La preparación del hemolizado, el tampón y la solución lisante se hace exactamente de la misma forma que para el análisis de la G6PD. En el análisis de la PK es particularmente importante eliminar tantos leucocitos y plaquetas contaminantes como sea posible, porque se puede dar el caso de que estas células no sufran la deficiencia que afecta a los hematíes y su actividad PK puede ser alta. El principio del análisis es el siguiente:

$$\text{FEP} + \text{ADP} \xrightarrow{\text{PK}} \text{piruvato} + \text{ATP}$$

El piruvato así formado se reduce a lactato en una reacción catalizada por la lactato deshidrogenasa (LDH) con conversión del NADH (forma reducida del nicotina adenina dinucleótido) a NAD:

$$\text{piruvato} + \text{NADH} \xrightarrow{\text{LDH}} \text{lactato} + \text{NAD}$$

Para garantizar que esta reacción secundaria no limite la producción, se añade LDH en exceso a la mezcla reactiva y se mide la actividad de la PK por la tasa de caída de la absorbancia a 340 nm.

La reacción se lleva a cabo en un tubo de 1 ml a 30 °C y los requisitos para la misma se satisfacen añadiendo al tubo todos los reactivos mostrados en la tabla 10.6 a excepción del sustrato FEP e incubándolos a 30 °C durante 10 min antes de que la reacción comience con la adición del FEP.

Las cantidades que se deben añadir en condiciones de bajo sustrato se muestran también en la tabla 10.6.

El cambio en la absorbancia (A) se mide en los primeros 5 min y la actividad de la enzima en micromoles de NADH reducido/min/ml de hemolizado se calcula de la siguiente forma:

$$\frac{\Delta A/\text{min}}{6{,}22} \times 10$$

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 10.6. Reactivos para el análisis de la piruvatocinasa

Reactivos	Análisis (µl)	Blanco (µl)	Bajo-S (µl)
Tampón Tris-HCl EDTA pH 8,0	100	100	100
KCl 1 mol/l	100	100	100
$MgCl_2$ 100 mmol/l	100	100	100
NADH 2 mmol/l	100	100	100
ADP, neutralizado 30 mmol/l	50	–	20
LDH 60 u/ml	100	100	100
Hemolizado 1:20	20	20	20
Agua	330	380	455
FEP 50 mmol/l	100	100	5

ADP, adenina difosfato; Bajo-S, condiciones de sustrato bajo; EDTA, ácido etilendiaminotetraacético; FEP, fosfoenolpiruvato; LDH, lactato deshidrogenasa; NADH, forma reducida del nicotina adenina dinucleótido.

donde 6,22 es el coeficiente de extinción milimolar del NADH a 340 nm.

Los resultados se expresan como para la G6PD.

Se debe realizar el análisis de un blanco para asegurarse de que la LDH está libre de actividad de la PK. Utilizar la solución estabilizante 2-mercapto-etanol-EDTA (v. pág. 192) en lugar del hemolizado tanto para las mezclas del blanco como para las del sistema. Si no se observa ningún cambio en la absorbancia, lo que indica que la LDH está libre de PK contaminante, no es necesario volver a confirmarlo en los análisis sucesivos. En caso contrario, la tasa del blanco debe sustraerse cada vez que se calcule la actividad enzimática real.

Valores normales

Como con todos los análisis enzimáticos, cada laboratorio debe determinar su intervalo de normalidad. Sin embargo, los valores no deben ser muy diferentes entre los laboratorios si se utilizan los métodos del ICSH. El intervalo normal de actividad de la PK a 30 °C es 10,3 ± 2 ue/g de Hb. Con concentraciones bajas de sustrato, la actividad normal es 15 ± 3% de las concentraciones altas de sustrato. El valor neonatal medio es alrededor del 140% del de los adultos[37].

Interpretación de los resultados

La PK, igual que la G6PD, es una enzima eritrocitaria dependiente de la edad. Pero a diferencia de la G6PD, el déficit de PK suele cursar con hemólisis crónica. Por tanto, los pacientes en los que se sospecha un déficit de PK presentan invariablemente reticulocitosis y, si el valor de PK está por debajo del intervalo de normalidad, se considera que existe un déficit de PK. De esta forma, una vez que el laboratorio ha determinado la técnica y los valores normales y siempre que se incluyan muestras control, el principal problema es de infradiagnóstico, más que de sobrediagnóstico, del déficit de PK. En el método recomendado se ha incluido una forma para recoger las variantes anómalas (es decir, la utilización de bajas concentraciones de sustrato). Incluso así, se puede pasar por alto el déficit de PK debido a que una reticulocitosis marcada puede aumentar notablemente la actividad de la enzima. Esto significa que una actividad de PK dentro del intervalo de normalidad en presencia de reticulocitosis marcada es altamente indicativa de un déficit heredado de PK (porque en la reticulocitosis la actividad debería ser superior a la normal). En tales casos, no se debe dar demasiada importancia a los estudios familiares. Los heterocigotos tienen una actividad de la PK cercana al 50% de la normal, a veces inferior, pero no presentan hemólisis. Por tanto, los padres heterocigotos de un paciente pueden tener una actividad PK eritrocitaria inferior a la de sus descendientes con déficit homocigoto de PK; este hallazgo puede reforzar el diagnóstico. En este contexto, el análisis de una enzima eritrocitaria alternativa dependiente de la edad (p. ej., la G6PD o la hexocinasa) puede ser una ayuda útil para la interpretación.

ESTIMACIÓN DEL GLUTATIÓN REDUCIDO[46]

El hematíe tiene una concentración elevada de GSH, el tripéptido que contiene un grupo sulfhidrilo. Una importante función del GSH en el hematíe es la desintoxicación de las pequeñas concentraciones de peróxido de hidrógeno que se pueden formar espontáneamente o como resultado de la administración de fármacos. El GSH puede también contribuir al mantenimiento de la integridad del hematíe reduciendo los grupos sulfhidrilo de la Hb, las proteínas de la membrana y las enzimas que puedan haber sido oxidadas. La función principal de la vía alternativa de la hexosa monofosfato es el mantenimiento de los valores normales de GSH. La reducción del GSSG (glutatión oxidado) volviendo a formar un GSH funcional está ligada a las tasa de reducción del $NADP^+$ en el paso inicial de la vía alternativa.

Principio

El método descrito se basa en el desarrollo de un color amarillo cuando el 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (reactivo de Ellman, DTNB) se añade a los compuestos sulfhidrilo. El color que se desarrolla es bastante estable durante cerca de 10 min y la reacción resulta poco afectada por las variaciones en la temperatura.

La reacción se lee a 412 nm. El GSH en los hematíes es relativamente estable y las muestras de sangre venosa anticoagulada con ACD mantienen los valores de GSH hasta 3 semanas a 4 °C. El GSH se oxida lentamente en la solución, por lo que sólo se deben utilizar lisados frescos para el análisis.

Reactivos

Solución lisante

EDTA disódico, 1 g/l.

Reactivo precipitador

Ácido metafosfórico (varillas), 1,67 g; EDTA disódico, 0,2 g; NaCl, 30 g; agua hasta 100 ml.

La solución es más rápida si los reactivos se añaden al agua hirviendo y el volumen se prepara tras el enfriamiento. Esta solución es estable durante al menos 3 semanas a 4 °C. Si queda algún resto de EDTA sin disolver, se debe utilizar el sobrenadante claro.

Disodio hidrógeno fosfato

300 mmol/l. $Na_2HPO_4.12H_2O$, 107,4 g/l, o $Na_2HPO_4.2H_2O$, 53,4 g/l o Na_2HPO_4 anhidro, 4,6 g/l.

Reactivo DTNB

Disolver 20 mg de DTNB en 100 ml de tampón a pH 8,0. El citrato trisódico, 34 mmol/l (10 g/l) o el Tris/HCl (v. pág. 589) son tampones adecuados.

La solución es estable hasta 3 meses a 4 °C.

Estándares de glutatión

Para construir las curvas estándar, las diluciones adecuadas se hacen a partir de una solución de depósito del GSH, 1,62 mmol/l (50 mg/dl).

En cada tanda debe hacerse una nueva solución de depósito con agua sin gas (hervida) o con solución salina, ya que el GSH se oxida lentamente en la solución.

Método

Añadir 0,2 ml de sangre anticoagulada bien mezclada, de la que se haya determinado el Hto, el recuento eritrocitario y la Hb, a 1,8 ml de solución lisante y dejarla reposar a temperatura ambiente durante no más de 5 min hasta que la lisis se complete.

Añadir 3 ml de solución precipitante, mezclar bien la solución y dejarla reposar durante otros 5 min.

Después de volverla a mezclar, filtrarla a través de un papel de filtro Whatman del n.º 42 de un solo espesor.

Añadir 1 ml del filtrado claro a 4 ml de solución de Na_2HPO_4 recién preparada. Registrar la absorbancia a 412 nm (A_1). Después añadir 0,5 ml del reactivo DTNB y mezclarlos bien por inversión.

El color aparece rápidamente y se mantiene estable durante cerca de 10 min. Hacer una lectura de su desarrollo a 412 nm en un espectrómetro (A_2).

Se prepara un blanco reactivo utilizando solución salina o plasma en lugar de sangre total.

Si los análisis se realizan con ciertra frecuencia, no es necesario construir curvas estándar para cada lote. Sin embargo, inicialmente son esenciales para calibrar el aparato utilizado y deben trazarse regularmente para confirmar la idoneidad de los reactivos. Las diluciones adecuadas del GSH se consiguen sustituyendo 5, 10, 20 y 40 µl de la solución de depósito 1,62 mmol/l (llevar hasta 0,2 ml con la solución lisante) por sangre en la reacción.

Cálculo

Determinación del coeficiente de extinción (ε)

El coeficiente de extinción molar del cromóforo a 412 nm es 13.600. Esto es aplicable únicamente cuando se dispone de una longitud de onda de banda estrecha. Cuando se utiliza una banda más ancha, el coeficiente de extinción es menor.

El sistema puede calibrarse comparando la absorbancia de extinción en el sistema de prueba (D_2) con la obtenida en un espectrómetro con una banda estrecha a 412 nm (D_1). El factor de corrección que se obtiene, E_1, viene dado por D_1/D_2 y es constante para el sistema de prueba.

Cálculo de la concentración del GSH

La cantidad de GSH en el tubo de muestra (GSH_c) viene dada por la siguiente fórmula:

$$\Delta A^{412} \times \frac{E_1}{\varepsilon} \times 5{,}5\ \mu mol$$

La concentración del GSH en las muestras de sangre total es:

$$\frac{GSH_c \times 5}{0{,}2}\ \mu mol/ml$$

La unidad se expresa a menudo en términos de mg/dl de hematíes. El peso molecular del GSH es 307. De esta forma, el GSH en mg/dl de concentrado de hematíes viene dado por la siguiente fórmula:

$$\frac{GSH_c \times 5}{0{,}2} \times \frac{1}{PCV} \times 307 \times 100$$

Intervalo normal

El intervalo normal puede expresarse de diferentes formas (p. ej., 6,57 ± 1,04 µmol/g Hb o 223 ± 35 µmol [o 69 ± 11 mg]/dl de concentrado de hematíes). El valor neonatal medio es alrededor del 150% del de los adultos[37].

Significado

La reposición del glutatión en los hematíes maduros se consigue por la acción consecutiva de dos enzimas: γ-glutamilcisteína sintetasa y glutatión sintetasa. Aunque es muy raro, el déficit hereditario de cualquiera de las enzimas suprime virtualmente la síntesis del GSH. Las células deficitarias presentan una tendencia a la destrucción oxidativa y tienen una vida corta, lo que da como resultado una anemia hemolítica no esferocítica.

Se han descrito incrementos en el GSH en diversos trastornos como la diseritropoyesis, la mielofibrosis, el déficit de P5N y otras anemias hemolíticas congénitas raras de etiología desconocida.

Prueba de estabilidad del glutatión

Principio

En los sujetos normales, la incubación de los hematíes con el fármaco oxidante acetilfenilhidrazina tiene poco efecto sobre el contenido de GSH porque su oxidación la revierte la glutatión reductasa, que a su vez depende de la G6PD para el suministro al NADPH. Por tanto, en los sujetos con déficit de G6PD, la estabilidad del GSH está significativamente reducida.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Reactivos

Acetilfenilhidrazina

670 mmol/l. Disolver 100 mg en 1 ml de acetona.

Transferir volúmenes de 0,05 ml (con un contenido de 5 mg de acetilfenilhidrazina) con una pipeta en el fondo de tubos de vidrio de 12 × 75 mm. Secar el contenido de los tubos en una estufa a 37 °C, taparlos y almacenarlos en la oscuridad hasta que se utilicen.

Método

Puede utilizarse sangre venosa anticoagulada con EDTA, heparina o ACD; debe ser de extracción reciente o haberse almacenado previamente a 4 °C hasta 1 semana como mucho.

Añadir 1 ml a un tubo que contenga la acetilfenilhidrazina y colocar otro mililitro en un tubo similar que no contenga el compuesto químico. Invertir los tubos varias veces e incubarlos después a 37 °C.

Al cabo de 1 h, mezclar el contenido de los tubos una vez más e incubar los tubos durante otra hora. Transcurrido este tiempo, determinar y comparar las concentraciones de GSH en la muestra de prueba y en la muestra de control.

Interpretación

En los sujetos adultos normales, el glutatión eritrocitario se reduce como mucho un 20% por la incubación con acetilfenilhidrazina. En los sujetos con déficit de G6PD, la reducción es mayor: en los heterocigotos (mujeres), la caída puede representar cerca de un 50%, mientras que en los hemicigotos (hombres) el descenso es a menudo mucho mayor y puede llegar a ser casi total.

La prueba no es específica del déficit de G6PD, y otros déficit infrecuentes de la ruta de las pentosas fosfato pueden dar resultados anómalos.

Glutatión y estabilidad del glutatión en lactantes

Durante los primeros días tras el nacimiento, los hematíes tienen un contenido normal o elevado de GSH. Con la adición de acetilfenilhidrazina, el GSH es inestable tanto en los lactantes normales como en aquellos con deficiencia de G6PD. Sin embargo, en los lactantes normales la inestabilidad puede corregirse mediante la adición de glucosa, y cuando el lactante normal tiene 3-4 días las células se comportan como células de adulto[47,48].

2,3-DIFOSFOGLICERATO

La importancia de la concentración elevada de 2,3-DPG en los hematíes humanos fue descubierta casi al mismo tiempo por Chanutin y Curnish[49] y por Benesch y Benesch[50]. El 2,3-DPG se une en un lugar específico en la cadena β de la Hb y reduce su afinidad por el oxígeno por alteración del equilibrio de las así denominadas conformaciones T y R de la molécula. Cuanto mayor sea la concentración de 2,3-DPG, mayor será la presión parcial de oxígeno (pO_2) necesaria para producir la misma saturación de oxígeno de la Hb. Esto se refleja en un cambio en la curva de disociación del oxígeno, dependiente del 2,3-DPG.

La medición de la concentración de 2,3-DPG en los hematíes puede ser también útil para identificar el sitio probable donde se produce un déficit enzimático en la ruta metabólica. En general, los déficits enzimáticos causan un incremento en la concentración de los metabolitos intermedios por encima del nivel del bloqueo y una reducción en la concentración por debajo del mismo. Así, el 2,3-DPG está aumentado en el déficit de PK y reducido en el déficit de hexocinasa. Sin embargo, en la mayoría de los demás trastornos de la ruta glucolítica, la concentración de 2,3-DPG es normal, porque el aumento de actividad a través de la ruta de las pentosas fosfato permite un flujo normal de los metabolitos a través de la parte de las triosas de la ruta glucolítica.

Determinación del 2,3-difosfoglicerato eritrocitario

Se han utilizado diversos métodos para analizar el 2,3-DPG. Krimsky[51] utilizó las propiedades catalíticas del 2,3-DPG en la conversión del 3-fosfoglicerato (3PG) en 2-fosfoglicerato (2PG) mediante la fosfoglicerato mutasa (PGM). A concentraciones muy bajas de 2,3-DPG, la velocidad de transformación es proporcional a la concentración de 2,3-DPG. Este método es interesante y extremadamente sensible pero demasiado engorroso para su uso rutinario. Lowry y cols.[52] describieron un método fluorimétrico que ha sido modificado para la espectrometría. Rose y Liebowitz[53] descubrieron que el glicolato-2-fosfato aumentaba la actividad de la 2,3-DPG fosfatasa de la PGM y sobre esta base se desarrolló un análisis cuantitativo del sustrato 2,3-DPG.

Principio

El 2,3-DPG se hidroliza a 3PG por la actividad fosfatasa de la PGM estimulada por el glicolato-2-fosfato. Esta reacción está unida a la conversión del NADH en NAD por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Ga3PD) y la fosfogliceratocinasa (PGK):

$$\text{2,3-DPG} \xrightarrow[\text{(glicolato-2-fosfato)}]{\text{2,3-DPG fosfatasa}} \text{3PG + Pi}$$

$$\text{3PG + ATP} \xrightarrow{\text{PGK}} \text{1,3-DPG + ADP}$$

$$\text{1,3-DPG + NADH} \xrightarrow{\text{Ga3PD}} \text{Ga3P + Pi + NAD+}$$

Se mide la caída en la absorbancia a 340 nm a medida que se oxida el NADH.

Reactivos

Tampón de trietanolamina

0,2 mol/l, pH 8,0.

Disolver 9,3 g de hidrocloruro de trietanolamina en 200 ml de agua; añadir después 0,5 g de EDTA disódico y 0,25 g

de $MgSO_4.7H_2O$. Ajustar el pH a 8,0 con KOH 2 mol/l (aproximadamente 15 ml) y completar el volumen hasta los 250 ml con agua.

ATP, sal sódica
20 mg/ml. Se disuelven en el tampón; si se congela, es estable durante varios meses.

NADH, sal sódica
10 mg/ml. Cuando se disuelve en el tampón es relativamente inestable y debe prepararse de nuevo cada día que se necesite.

Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa/fosfogliceratocinasa
Mezcla de suspensión cristalina en sulfato de amonio.

Fosfoglicerato mutasa
Suspensión cristalina de músculo de conejo en sulfato de amonio (c. 2.500 u/ml).

Glicolato-2-fosfato
Ácido 2-fosfoglicólico, 10 mg/ml. Después de disolverlo en agua, es estable durante varios meses si se mantiene congelado.

Método
Se puede utilizar sangre recién extraída en EDTA o heparinizada. Si se va a producir un retraso inevitable para comenzar el análisis, se debe añadir la sangre (4 volúmenes) al anticoagulante CPD (1 volumen) y almacenarlo a 4 °C. Al mismo tiempo se debe tomar una muestra de sangre para control.

Si se almacena la sangre de esta forma, los valores de 2,3-DPG son estables durante 48 h. La Hb, el recuento eritrocitario y el Hto deben medirse en parte de la muestra. No es necesario eliminar los leucocitos ni las plaquetas.

Desproteinización
Añadir 1 ml de sangre a 3 ml de ácido tricloroacético (TCA) 80 g/l en hielo fundente en un tubo cónico de centrifugadora de 10 ml.

Agitar vigorosamente el tubo, preferentemente sobre un mezclador con rotor automático y dejarlo después reposar durante 5-10 min para que se produzca una desproteinización completa. Es importante agitarlo; de lo contrario parte de la proteína precipitada permanecerá en la superficie de la mezcla.

Centrifugar aproximadamente a 1.200 g durante 5-10 min a 4 °C para obtener un sobrenadante claro. El 2,3-DPG en el sobrenadante es estable durante 2-3 semanas cuando se almacena a 4 °C; si se congela es estable indefinidamente.

Reacción
Dispensar los reactivos en un tubo de sílice o de vidrio de alta calidad, con un paso de luz de 1 cm. Las cantidades de la tabla 10.7 son para un tubo de 4 ml.

Tabla 10.7.

	Prueba	Blanco
Tampón de trietanolamina	2,50 ml	2,50 ml
ATP	100 µl	100 µl
NADH	100 µl	100 µl
Extracto desproteinizado	250 µl	–
Mezcla de Ga-3-PD/PGK	20 µl	20 µl
PGM	20 µl	20 µl
Agua	–	250 µl
	3,00 ml	3,00 ml

Calentar las mezclas a 30 °C durante 10 min y registrar las absorbancias de la muestra de prueba y de la usada como blanco a 340 nm. A continuación comenzar la reacción añadiendo 100 µl de glicolato-2-fosfato.

Volver a medir la absorbancia (a los 35 min) de las mezclas de prueba y blanco al finalizar la reacción.

Realizar mediciones posteriores después de transcurridos 5 min para confirmar que la reacción se ha completado.

Sólo se requiere un blanco por cada lote de muestras de prueba.

Cálculo
2,3-DPG (µmol/ml sangre)

$$= (\Delta A \text{ test} - \Delta A \text{ blank}) \times \frac{3{,}10}{6{,}22} \times 16$$

$$= (\Delta A \text{ test} - \Delta A \text{ blank}) \times 8 = D$$

donde 3,10 = volumen de la mezcla reactiva; 6,22 = coeficiente de extinción mmolar del NADH a 340 nm, y 16 = dilución de la muestra de sangre original (1 ml en 3,0 ml de TCA, 0,25 ml añadidos al tubo).

Los resultados de los análisis del 2,3-DPG se expresan mejor en términos de contenido de Hb o en volumen de hematíes. Así, si representamos con la letra D el resultado del cálculo anterior, entonces:

$$\frac{D \times 1.000}{(Hb)} = \text{2,3-DPG en µmol/g Hb}$$

o

$$\frac{D \times 1.000}{(Hb)} \times \frac{64}{1.000} = \text{2,3-DPG en µmol/µmol Hb}$$

y

$$D \times \frac{1}{PCV} = \text{2,3-DPG in µmol/ml hematíes (concentrado),}$$

donde Hb = Hb en g/l de sangre total, y 64 = el peso molecular de la Hb $\times 10^{-3}$.

El cociente molar de 2,3-DPG con respecto a la Hb en sangre normal es alrededor de 0,75:1.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Intervalo normal

El intervalo normal es 4,5-5,1 μmol/ml de concentrado de hematíes o 10,5-16,2 μmol/g de Hb. Los valores neonatales son cerca de un 20% inferiores a los de los adultos[37].

Cada laboratorio debe determinar su propio intervalo de normalidad.

Significado de la concentración del 2,3-DPG

El incremento en la concentración de 2,3-DPG se produce en la mayoría de trastornos en los que la sangre arterial está infrasaturada de oxígeno, como en las cardiopatías congénitas y en las enfermedades pulmonares crónicas, en la mayoría de las anemias adquiridas, a altitudes elevadas, en la alcalosis y en la hiperfosfatemia. Los valores reducidos del 2,3-DPG se producen en los estados de hipofosfatemia y en la acidosis.

La acidosis, que desplaza la curva de disociación del oxígeno hacia la derecha, produce una caída en el 2,3-DPG, de forma que la curva de disociación del oxígeno en sangre total de pacientes con acidosis crónica (como los pacientes en coma o en precoma diabético) puede tener curvas de disociación cercanas a lo normal. La corrección rápida de la acidosis producirá una desviación importante de la curva hacia la izquierda (es decir, hacia un aumento marcado en la afinidad de la Hb por el oxígeno, que puede conducir a la hipoxia tisular). Por tanto, se debe tener cuidado a la hora de corregir la acidosis.

La medición de la disociación del oxígeno se describe más adelante.

Desde el punto de vista diagnóstico, la principal importancia de la determinación del 2,3-DPG radica en: *a)* las anemias hemolíticas, y *b)* la interpretación de los cambios en la afinidad de la sangre por el oxígeno.

1. Como ya se ha mencionado, el 2,3-DPG aumentado o reducido puede relacionarse con déficits enzimáticos glucolíticos y el 2,3-DPG aumentado (hasta 2 a 3 veces el valor normal) es particularmente característico de la mayoría de los pacientes con déficit de PK. Aunque es verdad que este hallazgo no puede ser contemplado como diagnóstico, un valor normal o bajo del 2,3-DPG hace que el déficit de PK sea improbable.
2. Cuando se observe un desplazamiento en la curva de disociación del oxígeno y se sospeche una Hb anómala con alteración de la afinidad por el oxígeno, es esencial la determinación del 2,3-DPG. De hecho, hay una correlación simple entre el valor del 2,3-DPG y el p_{50}, a partir de la cual es posible determinar si un cambio en el p_{50} se explica por un valor alterado del 2,3-DPG[54].

Los valores del 2,3-DPG son, en general, ligeramente inferiores a lo normal en la EH y probablemente sean la causa de la ligera eritrocitosis que se observa a veces tras la esplenectomía. Se ha notificado una concentración extremadamente baja del 2,3-DPG eritrocitario asociada con eritrocitosis en una familia con un déficit completo de la 2,3-difosfoglicerato mutasa[55].

CURVA DE DISOCIACIÓN DEL OXÍGENO

La curva de disociación del oxígeno es la expresión de la relación entre la presión parcial de oxígeno y la saturación de oxígeno de la Hb. Los detalles de esta relación y la importancia fisiológica de los cambios en la misma fueron formulados en detalle al comienzo de este siglo por los grandes fisiólogos Hüfner, Bohr, Barcroft, Henderson y muchos otros. Sus trabajos los resumieron Peters y Van Slyke en *Quantitative Clinical Chemistry, Volume 1*[56]. Los capítulos pertinentes de este libro han sido reimpresos y sería difícil mejorar su descripción de la importancia de la curva de disociación del oxígeno:

> El valor fisiológico de la Hb como transportador del oxígeno descansa en el hecho de que su afinidad por el mismo está tan cuidadosamente equilibrada que en los pulmones la Hb se oxigena al 95-96%, mientras que en los tejidos y capilares puede aportar tanto gas como sea necesario. Si la afinidad fuera mucho menor, no se podría alcanzar una completa oxigenación en los pulmones; si fuera mayor, los tejidos tendrían dificultades para extraer de la sangre el oxígeno que necesitan. Debido a este ajuste de la afinidad, tanto la oxihemoglobina como la Hb reducida existen en todo el árbol circulatorio pero en unas proporciones extremadamente variables.

Determinación de la curva de disociación del oxígeno

La determinación de la curva de disociación del oxígeno depende de dos mediciones: la pO_2 con la cual la sangre está en equilibrio, y la proporción de Hb saturada con el oxígeno. Los métodos para definir la curva de disociación se pueden clasificar en tres grupos principales:

1. La pO_2 se establece en condiciones experimentales y se mide el porcentaje de saturación de la Hb.
2. Se determina de antemano el porcentaje de saturación mezclando proporciones conocidas de sangre oxigenada y desoxigenada, y se mide la pO_2.
3. El cambio en el contenido de oxígeno de la sangre se representa continuamente contra la pO_2 durante la oxigenación o la desoxigenación y se calcula el porcentaje de saturación.

La diversidad de métodos disponibles para medir la curva de disociación del oxígeno sugiere que ninguno de ellos es ideal. Se han revisado las ventajas y desventajas de las diversas técnicas[57,58]. El estándar con el que se comparan los nuevos métodos es el método gasométrico de Van Slyke y Neill[59]. Este método es lento, exige una considerable experiencia y no es adecuado para la mayoría de los laboratorios de hematología. Actualmente disponemos de instrumentos comercializados para realizar la prueba y trazar la curva completa de disociación del oxígeno[e]. Tales analiza-

[e] Por ejemplo, Hemox-Analyzer, TCS Scientific Corporation.

dores son extremadamente rápidos y exactos y son, por tanto, ideales para los laboratorios que desarrollan determinaciones múltiples. La medición aproximada de la saturación de oxígeno de la Hb puede también obtenerse a la cabecera de la cama del enfermo mediante una pulsioximetría no invasiva.

Interpretación

La figura 10.6 muestra la naturaleza sigmoidea de la curva de disociación del oxígeno de la Hb-A y el efecto de los iones hidrógeno sobre la posición de la curva. La desviación de la curva hacia la derecha indica una reducción de la afinidad de la Hb por el oxígeno y, por tanto, un aumento de la tendencia a ceder el oxígeno a los tejidos; la desviación hacia la izquierda indica un aumento de la afinidad y, en consecuencia, una tendencia aumentada de la hemoglobina para captar y retener el oxígeno. Los iones hidrógeno, el 2,3-DPG y algunos otros fosfatos orgánicos como el ATP desvían la curva hacia la derecha. El grado de desviación de la curva puede expresarse por medio de la $p_{50}O_2$ (es decir, la presión parcial de oxígeno a la que se satura el 50% de la hemoglobina).

La afinidad del oxígeno, representada por la $p_{50}O_2$, está relacionada con la compensación en las anemias hemolíticas[60]; 1 g de Hb puede transportar cerca de 1,34 ml de O_2. La figura 10.7 muestra las curvas de disociación del O_2 de la Hb-A y de la Hb-S trazadas según el volumen del oxígeno contenido en 1 l de sangre cuando las concentraciones de Hb son 146 g/l y 80 g/l respectivamente. La $p_{50}O_2$ de la Hb-A se obtiene a los 26,5 mmHg (3,5 kPa) y la de la Hb-S a los 36,5 mmHg (4,8 kPa). Se observará que en el cambio de saturación arterial a venosa, se aporta el mismo volumen de oxígeno a pesar de la diferencia en la concentración de hemoglobina. Los pacientes con una $p_{50}O_2$ elevada consiguen una Hb estable a un nivel inferior al normal, por lo que habrá que tener en cuenta este hecho al planificar una transfusión para estos pacientes.

Efecto Bohr

El aumento en la concentración de CO_2 produce una desviación hacia la derecha (es decir, una reducción en la afinidad por el oxígeno). Este efecto, descrito originalmente por C. Bohr[61], se debe sobre todo a los cambios en el pH, aunque el CO_2 en sí mismo tiene cierto efecto directo. El efecto Bohr tiene un valor numérico, $\Delta \log p_{50}O_2 / \Delta$ pH, donde $\Delta \log p_{50}O_2$ es el cambio en la $p_{50}O_2$ producido por un cambio en el pH (Δ pH). El valor normal del efecto Bohr a un pH y una temperatura fisiológicos es alrededor de 0,45.

Constante de Hill («n»)

La constante de Hill («n») representa el número de moléculas de oxígeno que se combinan con una sola molécula de Hb[62]. Los experimentos mostraron que el valor era de 2,6 en lugar del 4 esperado. La explicación descansa en el efecto que tiene la unión de una molécula de oxígeno a la Hb sobre la afinidad para que se unan otras moléculas de oxígeno; se trata del denominado efecto alostérico de la interacción hemo-hemo: «n» es una medición de este efecto y el cálculo del valor de «n» ayuda a identificar las Hb anómalas, cuya anomalía molecular conduce a interacciones anómalas hemo-hemo[63].

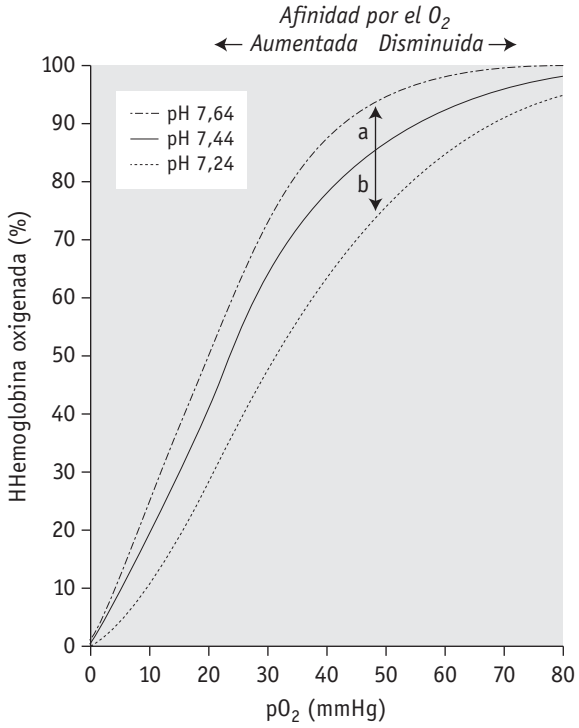


Figura 10.6. Efecto del pH sobre la curva de disociación del oxígeno.

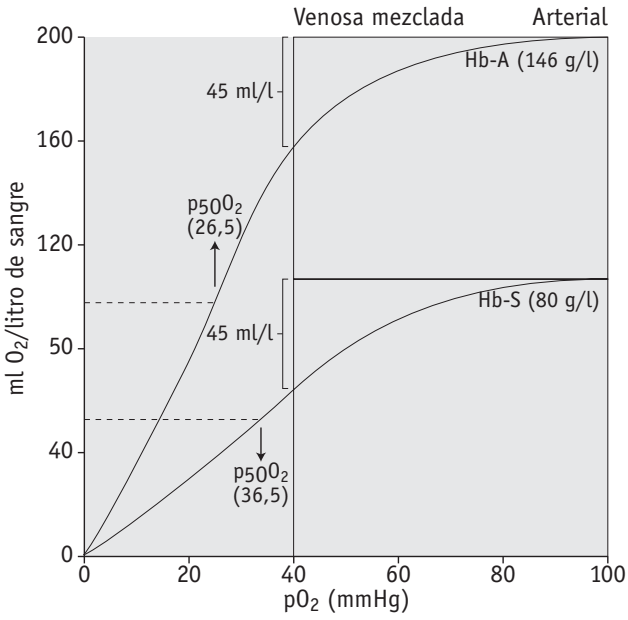


Figura 10.7. Efectos de la afinidad del O_2 en el suministro de O_2 a los tejidos.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

BIBLIOGRAFÍA

1. Parpart AK, Lorenz PB, Parpart ER, et al 1947 The osmotic resistance (fragility) of human red cells. Journal of Clinical Investigation 26:636-640.
2. Murphy JR 1967 The influence of pH and temperature on some physical properties of normal erythrocytes and erythrocytes from patients with hereditary spherocytosis. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 69:758-775.
3. Suess J, Limentani D, Dameshek W, et al 1948 A quantitative method for the determination and charting of the erythrocyte hypotonic fragility. Blood 3:1290-1303.
4. Jacob HS, Jandl JH 1964 Increased cell membrane permeability in the pathogenesis of hereditary spherocytosis. Journal of Clinical Investigation 43:1704-1720.
5. Cooper RA 1970 Lipids of human red cell membrane normal composition and variability in disease. Seminars in Hematology 7:296-322.
6. Dacie Sir John 1985 The haemolytic anaemias, Vol. 1. The hereditary haemolytic anaemias, part 1. Churchill Livingstone, Edinburgh. (a) p 292, (b) p 146, (c) p 352.
7. Gunn RB, Silvers DN, Rosse WF 1972 Potassium permeability in b-thalassaemia minor red blood cells. Journal of Clinical Investigation 51:1043-1050.
8. King M-J, Behrens J, Rogers C et al 2000 Rapid flow cytometric test for the diagnosis of membrane cytoskeleton-associated haemolytic anaemia. British Journal of Haematology 111:924-933.
9. Golan DE, Corbett JD, Korsgren C et al 1996 Control of band 3 lateral and rotational mobility by band 4.2 in intact erythrocytes: release of band 3 oligomers from low affinity binding sites. Biophysical Journal 70:1534-1542.
10. Gottfried EL, Robertson NA 1974 Glycerol lysis time as a screening test for erythrocyte disorders. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 83:323-333.
11. Gottfried EL, Robertson NA 1974 Glycerol lysis time of incubated erythrocytes in the diagnosis of hereditary spherocytosis. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 84:746-751.
12. Zanella A, Izzo C, Rebulla P, et al 1980 Acidified glycerol lysis test: a screening test for spherocytosis. British Journal of Haematology 45:481-486.
13. Streichman S, Gescheidt Y 1998 Cryohemolysis for the detection of hereditary spherocytosis: correlation studies with osmotic fragility and autohemolysis. American Journal of Hematology 58:206-210.
14. Selwyn JG, Dacie JV 1954 Autohemolysis and other changes resulting from the incubation in vitro of red cells from patients with congenital hemolytic anemia. Blood 9:414-438.
15. Morris LD, Pont A, Lewis SM 2001 Use of the HemoCue for measuring haemoglobin at low concentrations. Clinical and Laboratory Haematology 23:91-96.
16. de Gruchy GC, Santamaria JN, Parsons IC, et al 1960 Nonspherocytic congenital hemolytic anemia. Blood 16:1371-1397.
17. Beutler E 1978 Why has the autohemolysis test not gone the way of the cephalin floculation test? Blood 51:109-110.
18. Palek J, Jarolim P 1993 Clinical expression and laboratory detection of red blood cell membrane protein mutations. Seminars in Hematology 30:249-283.
19. Beutler E 1984 Red cell metabolism. A manual of biochemical methods, 2nd ed., Grune & Stratton, Orlando.
20. Beutler E, Blume KG, Kaplan JC, et al 1979 International Committee for Standardization in Haematology. Recommended screening test for glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficiency. British Journal of Haematology 43:465-477.
21. World Health Organization Scientific Group 1967 Standardization of procedures for the study of glucose-6-phosphate dehydrogenase. Technical Report Series, No. 366. WHO, Geneva.
22. Beutler E, Mitchell M 1968 Special modification of the fluorescent screening method for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Blood 32:816-818.
23. Brewer GJ, Tarlov AR, Alving AS 1962 The methemoglobin reduction test for primaquine-type sensitivity of erythrocytes. A simplified procedure for detecting a specific hypersusceptibility to drug hemolysis. Journal of the American Medical Association 180:386-388.
24. Fujii H, Takahashi K, Miwa S 1984 A new simple screening method for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Acta Haematologica Japonica 47:185-188.
25. Lyon MF 1961 Gene action in the X-chromosomes of the mouse (Mus musculus L.). Nature (London) 190:372-373.
26. Fairbanks VF, Lampe LT 1968 A tetrazolium-linked cytochemical method for estimation of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in individual erythrocytes: applications in the study of heterozygotes for glucose-6-phoshate dehydrogenase deficiency. Blood 31:589-603.
27. Gall JC, Brewer GJ, Dern RJ 1965 Studies of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity of individual erythrocytes: the methemoglobin-elution test for identification of females heterozygous for G6PD deficiency. American Journal of Human Genetics 17:350-363.
28. Tönz O, Rossi E 1964 Morphological demonstration of two red cell populations in human females heterozygous for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Nature (London) 202:606-607
29. Kleihauer E, Betke K 1963 Elution procedure for the demonstration of methaemoglobin in red cells of human blood smears. Nature (London) 199:1196-1197
30. Vogels IMC, Van Noorden CJF, Wolf BHM et al 1986 Cytochemical determination of heterozygous glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in erythrocytes. British Journal of Haematology 63:402-405
31. Valentine WN, Fink K, Paglia DE, et al 1974 Hereditary haemolytic anaemia with human erythrocyte pyrimidine 5¢-nucleotidase deficiency. Journal of Clinical Investigation 54:866-879.
32. Torrance J, West C, Beutler E 1977 A simple radiometric assay for pyrimidine 5'-nucleotidase. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 90:563-568.
33. International Committee for Standardization in Haematology 1989 Recommended screening test for pyrimidine 5¢-nucleotidase deficiency. Clinical and Laboratory Haematology 11:55-56.
34. Fairbanks LD, Jacomelli G, Micheli V et al 2002 Severe pyridine nucleotide depletion in fibroblasts from Lesch-Nyhan patients. Biochemical Journal 366:265-272.
35. International Committee for Standardization in Haematology 1977 Recommended methods for red-cell enzyme analysis. British Journal of Haematology 35:331-340.
36. Konrad PN, Valentine WN, Paglia DE 1972 Enzymatic activities and glutathione content of erythrocytes in the newborn. Comparison with red cells of older normal subjects and those with comparable reticulocytosis. Acta Haematologica 48:193-201.

37. Oski FA 1969 Red cell metabolism in the newborn infant: V. Glycolytic intermediates and glycolytic enzymes. Pediatrics 44:84-91.
38. Luzzatto L, Mehta A 1989 Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. In: Scriver CR, Beaudet A, Sly WS, Valle D (eds) The metabolic basis of inherited disease, pp. 2237-2265. McGraw-Hill, New York.
39. Yoshida A, Beutler E, Motulsky AG 1971 Human glucose-6-phosphate dehydrogenase variants. Bulletin of the World Health Organization 45:243-253.
40. World Health Organization Scientific Group on Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase 1990 Bulletin of the World Health Organization, 67:601.
41. Vulliamy TJ, D'urso M, Battistuzzi G et al 1988 Diverse point mutations in the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene cause enzyme deficiency and mild or severe hemolytic anemia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 85:5171-5175.
42. Beutler E 1989 Glucose-6-phosphate dehydrogenase: new perspectives. Blood 73:1397-1401.
43. Miwa S, Fujii H, Takegawa S, et al 1980 Seven pyruvate kinase variants characterised by the ICSH recommended methods. British Journal of Haematology 45:575-583.
44. Miwa S, Nakashima K, Ariyoshi K et al 1975 Four new pyruvate kinase (PK) variants and a classical PK deficiency. British Journal of Haematology 29:157-169.
45. International Committee for Standardization in Haematology 1979 Recommended methods for the characterisation of red cell pyruvate kinase variants. British Journal of Haematology 43:275-286.
46. Beutler E, Duron O, Kelly B 1963 Improved method for the determination of blood glutathione. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 61:882-888.
47. Lubin BH, Oski FA 1967 An evaluation of screening procedures for red cell glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the newborn infant. Journal of Pediatrics 70:488-492.
48. Zinkham WH 1959 An in-vitro abnormality of glutathione metabolism in erythrocytes from normal newborns: mechanism and clinical significance. Pediatrics 23:18-32.
49. Chanutin A, Curnish RR 1967 Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes. Archives of Biochemistry and Biophysics 121:96-102.
50. Benesch R, Benesch RE 1967 The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of haemoglobin. Biochemical and Biophysical Research Communications 26:162-167.
51. Krimsky I 1965 D-2,3-diphosphoglycerate. In: Bergmeyer HU (ed) Methods of enzymatic analysis. Academic Press, New York.
52. Lowry OH, Passonneau JV, Hasselberger FX, et al 1964 Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain, p 238. Journal of Biological Chemistry 239:18-30.
53. Rose ZB, Liebowitz J 1970 Direct determination of 2,3-diphosphoglycerate. Annals of Biochemistry and Experimental Medicine 35:177-180.
54. Duhm J 1971 Effects of 2,3-diphosphoglycerate and other organic phosphate compounds on oxygen affinity and intracellular pH of human erythrocytes. Pflügers Archiv für die gesampte Physiologie des Menschen und der Tiere 326:341-356.
55. Rosa R, Prehu MO, Beuzard Y, et al 1978 The first case of a complete deficiency of diphosphoglycerate mutase in human erythrocytes. Journal of Clinical Investigation 62:907-915.
56. Peters JP, Van Slyke DD 1931 Hemoglobin and oxygen. In: Quantitative clinical chemistry, vol. 1. Interpretations, p 525. Williams & Wilkins, Baltimore.
57. Bellingham AJ, Lenfant C 1971 Hb affinity for O2 determined by O2-Hb dissociation analyser and mixing technique. Journal of Applied Physiology 30:903-904.
58. Torrance JD, Lenfant C 1969 Methods for determination of O2 dissociation curves, including Bohr effect. Respiration Physiology 8:127-136.
59. Van Slyke DD, Neill JM 1924 The determination of gases in blood and other solutions by vacuum extraction and manometric measurement. Journal of Biological Chemistry 61: 523-573.
60. Bellingham AJ, Huehns ER 1968 Compensation in haemolytic anaemias caused by abnormal haemoglobins. Nature (London) 218:924-926.
61. Bohr C, Hasselbach K, Krogh A 1904 Ueber einen in biologischer Beziehung wichtigen Einfluss, den die Kohlensäurespannung des Blutes auf dessen Sauerstoffbindungübt. Skandinavisches Archiv für Physiologie 16:402.
62. Hill AV 1910 The possible effect of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. Journal of Physiology 40:4.
63. Bellingham AJ 1972 The physiological significance of the Hill parameter 'n'. Scandinavian Journal of Haematology 9:552-556.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

11 Anemias hemolíticas adquiridas

Barbara J. Bain y Nay Win

Valoración de la probabilidad de presentar una anemia hemolítica adquirida 205
Valoración de la extensión sanguínea y del hemograma ante la sospecha de una anemia hemolítica adquirida 205
Anemias hemolíticas inmunes 205
Tipos de autoanticuerpo 206
Métodos de investigación 209
Anemia hemolítica inducida por oxidantes 222
Anemias hemolíticas microangiopáticas y mecánicas 223
Hemoglobinuria paroxística nocturna 223
Prueba de la lisis en suero acidificado (prueba de Ham) 224
Prueba de la lisis en suero acidificado con adición de magnesio (prueba de Ham modificada) 226
Prueba de la lisis en sucrosa 226
Análisis por citometría de flujo de las proteínas unidas al GPI en los hematíes 226
Análisis por citometría de flujo de las proteínas unidas al GPI en los neutrófilos 227
Hematíes tipo HPN 228
Resumen de las pruebas para la HPN 228

VALORACIÓN DE LA PROBABILIDAD DE PRESENTAR UNA ANEMIA HEMOLÍTICA ADQUIRIDA

La anemia hemolítica puede sospecharse ya sea por anomalías clínicas o de laboratorio. Las características clínicas sugestivas son la anemia, la ictericia y la esplenomegalia. Otras características clínicas pertinentes que deben buscarse son los antecedentes de enfermedad autoinmune, la transfusión sanguínea reciente, la infección reciente, la exposición a fármacos o a toxinas, la presencia de una prótesis cardíaca y el riesgo de paludismo.

Las investigaciones básicas de laboratorio que deben realizarse ante una sospecha de anemia hemolítica se enumeran en el capítulo 9. Las pruebas descritas en el presente capítulo son más específicas para el diagnóstico de una anemia hemolítica adquirida.

VALORACIÓN DE LA EXTENSIÓN SANGUÍNEA Y DEL HEMOGRAMA ANTE LA SOSPECHA DE UNA ANEMIA HEMOLÍTICA ADQUIRIDA

Ante la sospecha de una anemia hemolítica, se debe realizar siempre un hemograma completo, un recuento de reticulocitos y una extensión sanguínea. El recuento sanguíneo muestra una concentración de hemoglobina (Hb) reducida y, habitualmente, un volumen corpuscular medio (VCM) aumentado. El aumento del VCM es atribuible al hecho de que los reticulocitos, que pueden constituir una parte significativa del total de hematíes, son mayores que los hematíes maduros. Las anomalías que pueden detectarse en una extensión sanguínea y su posible significado en la anemia hemolítica adquirida se muestran en la tabla 11.1. Las anomalías detectadas en la extensión sanguínea indicarán las pruebas complementarias que se deben realizar. Por ejemplo, la preparación para los cuerpos de Heinz tendrá importancia en caso de que existan células contraídas de forma irregular. De forma similar, la prueba de la antiglobulina directa (PAD) estará indicada si la extensión sanguínea muestra esferocitos. El diagnóstico diferencial de la sospecha de anemia hemolítica adquirida incluirá diversas formas heredadas de anemia hemolítica. Así, los esferocitos podrían atribuirse tanto a una esferocitosis hereditaria como a una anemia hemolítica auto o aloinmune. La hemólisis con células contraídas de forma irregular puede atribuirse no sólo a una exposición a los oxidantes sino también a una hemoglobina inestable, a la homocigosidad para la hemoglobina C o al déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

ANEMIAS HEMOLÍTICAS INMUNES

Las anemias hemolíticas adquiridas mediadas por la inmunidad son el resultado de autoanticuerpos desarrollados frente a los antígenos eritrocitarios propios del paciente o de aloanticuerpos en la circulación del paciente, ya estén presentes en el plasma o totalmente unidos a los hematíes (p. ej., hematíes transfundidos o neonatales). Los aloanticuerpos pueden hallarse en el plasma del paciente y reac-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 11.1. Anomalías que pueden detectarse en el examen de la extensión sanguínea y su posible significado

Anomalía morfológica observada en el examen de la extensión sanguínea	Sugerencia del tipo de anemia hemolítica adquirida
Esquistocitos	Síndromes de fragmentación incluyendo la anemia hemolítica microangiopática y la anemia hemolítica mecánica
Esferocitos	Anemia hemolítica autoinmune, aloinmunitaria o inmunitaria inducida por fármacos, quemaduras, hemoglobinuria paroxística por frío, sepsis por *Clostridium welchii*
Microesferocitos	Quemaduras, síndromes de fragmentación
Células contraídas de forma irregular	Daño oxidativo, síndrome de Zieve
Aglutinación marcada de los hematíes	Anemia hemolítica inducida por anticuerpos fríos
Aglutinación menor de los hematíes	Anemia hemolítica autoinmune por anticuerpos calientes, hemoglobinuria paroxística por frío
Hipocromía, microcitosis y punteado basófilo	Intoxicación por plomo
Eritrofagocitosis	Hemoglobinuria paroxística por frío
Linfocitos atípicos	Anemia hemolítica inducida por anticuerpos fríos asociada con mononucleosis infecciosa o, menos frecuentemente, con otras infecciones
Linfocitosis con linfocitos pequeños maduros y células desgarradas	Anemia hemolítica autoinmune asociada con leucemia linfocítica crónica
Trombocitopenia	Anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica trombótica, anemia hemolítica microangiopática asociada con coagulación intravascular diseminada, hemoglobinuria paroxística nocturna
Neutropenia	Hemoglobinuria paroxística nocturna
Características inespecíficas de los hematíes	Hemoglobinuria paroxística nocturna

cionar con los antígenos de los hematíes transfundidos del donante para producir una hemólisis. Los aloanticuerpos pueden también desarrollarse en el plasma materno y causar la enfermedad hemolítica del recién nacido. La anemia hemolítica autoinmune (AHA) puede ser «idiopática» o secundaria, relacionada principalmente con los trastornos linfoproliferativos y las enfermedades autoinmunes, sobre todo con el lupus eritematoso sistémico. La AHA puede ocurrir también tras una neumonía atípica *(Mycoplasma pneumoniae)*, una mononucleosis infecciosa y otras infecciones víricas. La hemoglobinuria paroxística por frío (HPF) pertenece también a este grupo de trastornos. En ocasiones, los fármacos pueden dar lugar a una anemia hemolítica de origen inmunológico que remeda en gran medida a la AHA idiopática tanto clínica como serológicamente. Éste fue un hallazgo relativamente común con α-metildopa (un fármaco que apenas se utiliza en la actualidad), pero a veces se produce también con otros fármacos. Un grupo mayor de fármacos origina un anticuerpo que está dirigido principalmente contra el fármaco y que sólo afecta secundariamente a los hematíes. Éste es un hecho poco común. Entre tales fármacos se encuentran la penicilina, la fenacetina, la quinidina, la quinina, la sal de sodio del ácido *p*-aminosalicílico, la salicilazosulfapiridina y las cefalosporinas[1].

Tipos de autoanticuerpo

El diagnóstico de una AHA requiere la evidencia de la anemia y de la hemólisis y la demostración de los autoanticuerpos unidos a los hematíes del paciente (es decir, una PAD positiva [v. pág. 211]). Una PAD positiva puede deberse también a la presencia de aloanticuerpos (p. ej., pertenecientes a una reacción transfusional hemolítica retardada), por lo que se deben buscar los detalles de cualquier transfusión en los meses anteriores.

A menudo, se puede demostrar la presencia de autoanticuerpos libres en el suero de un paciente que presenta una AHA. La facilidad para detectar los anticuerpos depende de la cantidad de anticuerpo producida, de su afinidad por el antígeno correspondiente en la superficie del eritrocito y del efecto de la temperatura sobre la adsorción del anticuerpo, así como de la técnica utilizada para detectarlo. Los autoanticuerpos relacionados con la AHA pueden dividirse en dos amplias categorías dependiendo del efecto de la temperatura sobre su interacción con el antígeno: *a)* anticuerpos calientes, capaces de combinarse fácilmente a 37 °C con su antígeno eritrocitario correspondiente, y *b)* anticuerpos fríos, que no pueden combinarse con el antígeno a 37 °C pero forman una combinación con el antígeno con una estabilidad creciente a medida que la temperatura cae desde los 30-32 °C hasta los 2-4 °C.

Tabla 11.2. Incidencia relativa de los distintos tipos de anemia hemolítica autoinmune[2]

	Hombres	Mujeres	Total
Anticuerpos calientes			
«Idiopática»	46	65	111
Asociada con fármacos (principalmente la α-metildopa)	1	10	11[a]
Secundaria			
Asociada con:			
Linfomas	14	23	37
Lupus eritematoso sistémico	1	15	16
Otros trastornos autoinmunitarios posibles o probables	8	13	21
Infecciones y miscelánea	9	4	13
Teratoma ovárico	0	1	1
Totales	79	131	210
Anticuerpos fríos			
«Idiopática» (CHAD)[b]	16	22	38
Secundaria			
Asociada con:			
Infección por *Mycoplasma pneumoniae* o atípica	5	18	23
Mononucleosis infecciosa	1	1	2
Linfoma	3	4	7
Hemoglobinuria paroxística por frío			
«Idiopática»	7	1	8
Otras secundarias	4	3	7
Totales	**36**	**49**	**85**

[a] Hay que observar que desde que se hizo este estudio ha disminuido el uso de α-metildopa, siendo actualmente una causa rara de anemia hemolítica.
[b] CHAD, enfermedad por hemaglutinina fría crónica. Aunque a menudo se contempla como «idiopática», en realidad es consecuencia de un trastorno linfoproliferativo oculto, que conduce a la producción de aglutininas frías por un clon de células neoplásicas.

Los casos de AHA pueden igualmente separarse en dos amplias categorías según las características de temperatura de los autoanticuerpos relacionados: AHA por anticuerpos calientes y, la menos frecuente, AHA por anticuerpos fríos. La frecuencia relativa de las dos categorías se ilustra en la tabla 11.2[2].

Autoanticuerpos calientes

El tipo más habitual de autoanticuerpo caliente es una inmunoglobulina G (IgG), que se comporta *in vitro* de forma muy similar a un aloanticuerpo contra el Rh; de hecho, muchos autoanticuerpos IgG tienen especificidad Rh. Los autoanticuerpos calientes IgA e IgM son mucho menos habituales, y cuando existen se han formado adicionalmente a un autoanticuerpo IgG (tabla 11.3)[3].

Es frecuente que los pacientes con una AHA por anticuerpo caliente hayan fijado complemento sobre sus hematíes, siendo éstos, por tanto, aglutinados por los antisueros específicos para el complemento o por un componente del complemento como el C3d (v. tabla 11.3). En estos casos es probable que el complemento no esté unido por un anticuerpo IgG, sino que su presencia en la superficie celular sea el resultado de la acción de pequeñas, y por otra parte indetectables, cantidades de autoanticuerpos IgM.

Tabla 11.3. Prueba de la antiglobulina directa en la anemia hemolítica autoinmune por anticuerpos calientes: incidencia de las diferentes reacciones al suero de la antiglobulina específico[3]

Anti-IgG	Anti-IgA	Anti-IgM	Anti-C'	N.º de pacientes	(%)
+	–	–	–	43	36
–	+	–	–	3	2
+	+	–	–	4	3
+	–	–	+	52	43
+	–	+	+	6	5
–	–	–	+	13	11
				121	**100**

Ig, inmunoglobulina.

A veces, los pacientes con una AHA por anticuerpos calientes parecen tener sólo complemento en la superficie del eritrocito. Esto es más difícil de interpretar porque las reacciones débiles de este tipo son frecuentes en pacientes con una diversidad de trastornos en los que hay poca eviden-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

cia de un aumento de la destrucción eritrocitaria. En algunos pacientes, éste puede ser el resultado de la unión de complejos inmunes circulantes con los hematíes.

Los autoanticuerpos calientes libres en el suero del paciente se detectan mejor por medio de la prueba de la antiglobulina indirecta (PAI) o con la utilización de hematíes tratados con enzimas (p. ej., tripsinizados o papainizados). (Los anticuerpos que aglutinan directamente *in vitro* a las células no modificadas se encuentran en contadas ocasiones.) No es infrecuente que los anticuerpos que aglutinan a las células tratadas con enzimas, a veces a títulos elevados, se encuentren en el suero de pacientes en los que la PAI utilizando células no modificadas sea negativa (tabla 11.4). En ocasiones, se encuentran también en el suero de pacientes en los que la PAD es negativa.

Los anticuerpos en el suero que se ha comprobado que lisan (en vez de simplemente aglutinar) los hematíes no modificados a 37 °C en presencia del complemento (hemolisinas calientes) son raramente demostrables[4a]. Si están presentes, es probable que el paciente sufra una hemólisis extremadamente grave. Los anticuerpos séricos que lisan y aglutinan los hematíes tratados con enzimas, pero no afectan a los no modificados, son, sin embargo, bastante habituales. Su especificidad es incierta (no son anti-Rh) y su presencia no está necesariamente relacionada con un aumento de la hemólisis.

Autoanticuerpos fríos

Los autoanticuerpos fríos son casi siempre del tipo IgM. *In vivo*, la mayoría no produce hemólisis, aunque una minoría puede originar una hemólisis intravascular crónica, cuya intensidad está influenciada de forma característica por la temperatura ambiente. Habitualmente, se hace referencia al cuadro clínico resultante como el síndrome o enfermedad por hemaglutininas frías (CHAD). La hemólisis se produce por destrucción de los hematíes por el complemento, que está fijado a la superficie eritrocitaria por una reacción antígeno-anticuerpo, y que se desarrolla en los vasos sanguíneos de la piel expuesta cuando la temperatura es de 28-32 °C o menor. El autoanticuerpo frío en el CHAD es monoclonal porque este síndrome es el resultado de un trastorno linfoproliferativo de bajo grado.

Los hematíes de los pacientes con CHAD dan, de forma característica, reacciones antiglobulina positivas únicamente con el suero anticomplemento (anti-C'). (La notación C' se utiliza para distinguir los anticuerpos anticomplemento de los anticuerpos anti-C del sistema Rh.) Esto se debe a los hematíes que han adsorbido, de forma irreversible, cantidades sublíticas de complemento; es, por tanto, un signo de una reacción antígeno-anticuerpo que se ha producido a una temperatura inferior a los 37 °C. El componente del complemento responsable de la reacción con el suero anti-C' es el C3dg derivado del C3 (v. pág. 422).

In vitro, un autoanticuerpo del tipo frío lisará, a menudo, a los hematíes normales a 20-30 °C en presencia de complemento humano fresco, sobre todo si la mezcla célula-suero se ha acidificado hasta un pH de 6,5-7,0; habitualmente, lisará con facilidad los hematíes tratados con enzima en suero no acidificado, pudiendo seguir produciéndose la aglutinación y la lisis de estas células a 37 °C.

Tabla 11.4. Resultados de las pruebas de autoanticuerpos libres en el suero de 210 pacientes con anemia hemolítica autoinmune por anticuerpos calientes[2]

Prueba de la antiglobulina indirecta (PAI)	Aglutinación de los hematíes tratados con enzimas a 37 °C	Lisis de hematíes tratados con enzimas a 37 °C	Aglutinación de hematíes normales a 20 °C	N.º y porcentaje de pacientes en el grupo	
+	+	+	+	4	
+	+	+	–	16	
+	+	–	–	64	41%
+	–	–	–	2	
+	–	–	+	1	
–	+	+	+	16	
–	+	+	–	31	40%
–	+	–	–	29	
–	+	–	+	7	
–	–	–	–	39	19%

Notas

1. En el 41% de los pacientes, la PAI fue positiva y en el 80% de los pacientes, las pruebas con células tratadas con enzimas fueron positivas (en la mitad de estos pacientes, la PAI fue negativa).
2. En el 19% de los pacientes, todas las pruebas fueron negativas.
3. En el 13% de los pacientes, los hematíes normales se aglutinaron a 20 °C, probablemente por aglutininas frías.

La mayoría de estos autoanticuerpos de tipo frío tienen una especificidad anti-I (es decir, reaccionan intensamente con la gran mayoría de los hematíes adultos y sólo débilmente con los hematíes del cordón umbilical). Una minoría son anti-i, reaccionando intensamente con células del cordón y débilmente con hematíes adultos. Más raramente, los anticuerpos tienen una especificidad anti-Pr o anti-M, reaccionando con antígenos en la superficie eritrocitaria que han sido destruidos por el tratamiento enzimático.

Otro tipo de anticuerpo frío, bastante diferente, aunque raramente detectado, es el anticuerpo de Donath-Landsteiner (D-L). Es una IgG y tiene una especificidad anti-P. El síndrome clínico que produce el anticuerpo es denominado HPF.

La HPF está causada por un autoanticuerpo IgG bifásico, habitualmente con especificidad anti-P, y se ve, por lo general, como un trastorno agudo en los niños. Este anticuerpo se une a los hematíes cuando hace frío pero activa el complemento y causa hemólisis al volver a calentarse a 37 °C. Los casos pueden ser idiopáticos o secundarios a una infección vírica aguda en los niños.

La PAD es positiva únicamente para el complemento. La negatividad de la detección del anticuerpo por la PAI estándar a 37 °C es habitual en un caso sugestivo de HPF dada la naturaleza de escasa amplitud térmica del autoanticuerpo. En los casos de HPF, si la investigación del anticuerpo se realiza a una temperatura inferior, podrían detectarse los anticuerpos fríos panreactivos, porque la mayoría de los autoanticuerpos muestran una especificidad anti-P con un intervalo de amplitud térmica de hasta 15-24 °C. Habitualmente, el título de anticuerpos es bajo (menor de 64), incluso cuando se investigan a 4 °C.

Algunas de las características de los anticuerpos IgG, IgM e IgA se enumeran en la tabla 11.5.

Los aspectos clínicos, hematológicos y serológicos de las AHA han sido resumidos por Dacie[4] y otros autores[5-9].

Tabla 11.5. Principales características de los autoanticuerpos IgG, IgM e IgA

	IgG	IgM	IgA
Peso molecular (daltons)	146.000	970.000	160.000
Constante de sedimentación (s)	7	19	7
Número de subtipos de cadena pesada	4	1	2
Atraviesan la placenta	Sí	No	No
Producen la activación del complemento	Sí	Sí	No
Causan la fijación de los monocitos/macrófagos	Sí	No	No
Número de sitios de unión al antígeno	2	5 o 10	2
Tipos de AHA producida	Caliente; PCH	Habitual-mente fría	Caliente

Ig, inmunoglobulina; AHA, anemia hemolítica autoinmune; HPF, hemoglobinuria paroxística por frío.

Métodos de investigación

Muchos de los métodos utilizados en la investigación de un paciente con sospecha de AHA se describen en el capítulo 19. Aquí daremos una descripción detallada de las precauciones que deben tenerse en cuenta al extraer las muestras de sangre de los pacientes y los métodos con un valor particular en la investigación.

Recogida de muestras de sangre y de suero

La determinación de la amplitud térmica real o del título de las aglutininas frías requiere que la muestra sanguínea se recoja y mantenga estrictamente a 37 °C hasta que se separen el suero y las células. Esto puede conseguirse recogiendo sangre venosa (muestra coagulada y muestra con EDTA) y conservándola caliente a 37 °C; de forma ideal, esto puede hacerse en un termo aislado, pero, por lo general, en la práctica se coloca el tubo de muestra en una cubeta que contenga agua a 37 °C.

Se dispondrá de hematíes capaces de eluir el anticuerpo, y el suero puede examinarse en busca de anticuerpo libre o de otras anomalías. Hay que centrifugar la muestra coagulada para separar el suero a 37 °C (p. ej., en una centrífuga ordinaria en cuyas cubetas se haya colocado agua caliente a 37-40 °C). La muestra con EDTA se utiliza para la PAD y otras pruebas relacionadas con los hematíes del paciente. Si en un caso particular se sabe que el autoanticuerpo es del tipo caliente, la sangre puede separarse a temperatura ambiente; en caso contrario, como ya se ha indicado, hay que hacerlo a 37 °C. Cuando se envíen las muestras por correo, es mejor enviar separadamente: *a)* el suero (separado a 37 °C), y *b)* la sangre total añadida a una solución con ACD o con CPD. Hay que mantener la esterilidad.

Almacenamiento de las muestras

Las muestras de la sangre del paciente, aunque se conservan bastante bien en ACD o en CPD a 4 °C, son más difíciles de preservar que los hematíes normales. En particular, si existe una esferocitosis marcada, se desarrollará una lisis considerable durante el almacenamiento. Sin embargo, se pueden obtener eluidos satisfactorios a partir de hematíes lavados que han permanecido congelados a –20 °C durante semanas o meses.

El suero del paciente debe mantenerse a –20 °C o por debajo en pequeños volúmenes (1-2 ml). Si hay que titular el complemento y la titulación no se realiza inmediatamente, se debe congelar el suero tan pronto como sea posible a –70 °C o a temperatura inferior.

Esquema para la investigación serológica de la anemia hemolítica sugestiva de origen inmunológico

Es importante considerar cuáles son las pruebas más útiles que se deben realizar y el orden en el que deben hacerse.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Se ha sugerido un esquema, diseñado en forma de preguntas y respuestas[10]. Sabiendo que cierta información puede ser de ayuda para clasificar el tipo de AHA, la consideración práctica más importante es determinar si, además de un autoanticuerpo, existe algún aloanticuerpo subyacente. Éste debe ser identificado antes de que se realice la transfusión para evitar una reacción hemolítica transfusional retardada que complicaría la hemólisis existente.

1. **¿Están los hematíes del paciente «recubiertos» por inmunoglobulinas o por complemento (lo que sería indicativo de una reacción antígeno-anticuerpo)?**
   Realizar una PAD utilizando un reactivo multiespecífico de «amplio espectro», que contenga tanto anti-IgG como anti-C'. (Si la PAD es negativa, es improbable, aunque no imposible, que el diagnóstico sea de una AHA. Véase AHA PAD negativa, pág. 213.)
2. **Si la PAD es positiva, ¿están las inmunoglobulinas o el complemento adsorbidos por los hematíes?**
   Repetir la PAD utilizando sueros monoespecíficos (v. pág. 430) (es decir, anti-IgG y anti-C3d).
3. **Si sobre los hematíes hay inmunoglobulinas, ¿son anticuerpos específicos?**
   Preparar eluidos a partir de los hematíes del paciente. Probarlos más tarde (v. número 6).
4. **¿Cuál es el grupo sanguíneo del paciente?**
   Determinar los tipos ABO, Rh D y Kell del paciente. El fenotipo Rh es particularmente importante en la AHA por anticuerpos calientes; si hay que diferenciar los aloanticuerpos de los autoanticuerpos se deben determinar otros antígenos (v. pág. 421).
5. **¿Hay anticuerpo libre en el suero? ¿Cómo reacciona y a qué temperaturas y por qué métodos puede evidenciarse? ¿Existe algún aloanticuerpo subyacente?**
   Cribar el suero con dos o tres suspensiones de hematíes adecuadas para la detección pretransfusional rutinaria de anticuerpos (v. pág. 457) en busca de aglutinación y de lisis a 37 °C por medio de la PAI (v. pág. 430). Si es positiva, identificar el anticuerpo utilizando un panel de identificación de anticuerpos.
   a) Si se identifica un aloanticuerpo, se debe seleccionar para la transfusión la sangre aquella a la que le falte el antígeno correspondiente.
   b) Si no se identifica un aloanticuerpo en el suero ni en el plasma, se puede asumir que no hay un aloanticuerpo presente, a menos que el paciente haya sido transfundido en el último mes; en este último caso, se requiere un eluido de hematíes, porque es posible que haya un aloanticuerpo unido a las células recientemente transfundidas y que no exista un anticuerpo libre que sea detectable en el suero/plasma.
   c) Si el autoanticuerpo es panreactivo (es decir, reacciona contra todas las células del panel), se necesitan las pruebas de adsorción del anticuerpo para eliminarlo de forma que se pueda identificar cualquier aloanticuerpo subyacente. Si el paciente no ha recibido una transfusión en los últimos 3 meses, está indicado realizar una prueba de autoadsorción con ZZAP (v. pág. 214). Si el paciente ha recibido una transfusión durante los últimos 3 meses, hay que realizar las pruebas de aloadsorción diferencial. Sin embargo, si el paciente ha tenido una transfusión en el último mes, se requiere un eluido, independientemente de los resultados de las pruebas de adsorción.
6. **Si hay un autoanticuerpo caliente, ¿cuál es la especificidad del autoanticuerpo?**
   Enfrentar también el suero a 20 °C contra las células detectoras de anticuerpo para demostrar si hay anticuerpos fríos o calientes, o una mezcla de los dos, en el suero.
   Probar el eluido contra el panel de hematíes para la identificación de anticuerpos con una PAI utilizando los hematíes tratados con enzimas (v. pág. 427). La titulación del autoanticuerpo puede ser de utilidad en presencia de un aloanticuerpo potente.
   Titular el suero/plasma con los métodos que han dado resultados positivos en la prueba de detección utilizando el mismo panel de hematíes (v. número 5a).
7. **Si hay un anticuerpo frío:**
   a) **¿Tiene alguna especificidad el anticuerpo? ¿Se trata de un autoanticuerpo o de un aloanticuerpo? ¿Cuál es su título?**
   b) **¿Cuál es la amplitud térmica del anticuerpo?**
   Enfrentar el suero/plasma contra un panel de células O a 20 °C, incluyendo A_1, A_2, B, células del cordón umbilical y las propias células del paciente. Si se encuentra un autoanticuerpo, titularlo a 4 °C con células de adulto (I) ABO compatibles, células del cordón umbilical (i) y células de adulto (i) (si es posible):
   a) Determinar la mayor temperatura a la que se produce la autoaglutinación de la sangre total del paciente (v. pág. 218).
   b) Titular el suero/plasma del paciente a 20, 30 y 37 °C con células O de adulto combinadas, células de cordón, células del propio paciente y el panel de células descrito anteriormente. Si se produce alguna aglutinación o lisis a los 37 °C en la prueba de detección (5(a)), titularlo con las células apropiadas a esta temperatura.
   c) Si se sospecha una HPF, realizar las pruebas de Donath–Landsteiner directa e indirecta en dos etapas (v. pág. 218).
8. **¿Se sospecha de algún fármaco como causante de la anemia hemolítica?**
   a) Si se sospecha una anemia hemolítica inducida por penicilina, probar la existencia de anticuerpos utilizando células preincubadas con el fármaco apropiado (v. pág. 221).
   b) Si se sospecha una hemólisis inducida por otros fármacos, añadir el fármaco en solución a una mezcla del suero del paciente, células normales y suero normal fresco (v. pág. 222). Mirar si hay aglutinación de las células normales y de las tratadas con enzimas y utilizar la PAI.
9. **¿Existen otras anomalías serológicas?**
   Considerar la realización de las siguientes pruebas: electroforesis de las proteínas del suero y estimación cuan-

titativa de las inmunoglobulinas, estimación del complemento, pruebas para el factor antinuclear, una prueba de detección de anticuerpos heterófilos (prueba de detección de la mononucleosis infecciosa) y una prueba para los anticuerpos del *Mycoplasma*.

El esquema recomendado resume lo que puede hacerse por medio de la investigación serológica en un paciente con sospecha de tener una AHA. La estrecha colaboración entre el clínico y el laboratorio ayuda a decidir las pruebas que deben realizarse en un caso particular.

Detección de anticuerpos incompletos por medio de la prueba de la antiglobulina directa (Coombs)

Principio

Como ya se ha descrito, la PAD consiste en estudiar las células del paciente sin exposición previa al anticuerpo *in vitro*. Para la investigación de casos de AHA, se pueden utilizar reactivos antiglobulina específicos para IgG, IgM, IgA, C3c y C3d.

Precauciones

Se utiliza con preferencia una muestra de sangre con EDTA. (Si se utiliza una muestra coagulada, el complemento podría estar unido por un anticuerpo normal, frío e incompleto, y dar un resultado falso positivo con anti-C3d.) Son necesarias ciertas precauciones al investigar a un paciente con una posible AHA. Si existe un autoanticuerpo que reaccione en frío, hay que lavar cuatro veces los hematíes del paciente en un gran volumen de solución salina[a] calentada hasta los 37 °C para eliminar los anticuerpos fríos y obtener una suspensión pura de células; no hay riesgo de eliminar los componentes del complemento adsorbidos. Sin embargo, el proceso de lavado debe concluirse tan rápidamente como sea posible y la prueba realizarse inmediatamente después porque, en ocasiones, el anticuerpo caliente unido se desprende de las células con el lavado y se pueden obtener resultados falsamente negativos. Si por cualquier razón se ha de interrumpir el proceso de lavado una vez que ha comenzado, se colocará la suspensión de células a 4 °C para enlentecer la disociación del anticuerpo.

Método

Se recomienda una técnica en tubo, como la descrita en la página 431.

Preparar una suspensión de hematíes al 2-5% que hayan sido lavados cuatro veces en solución salina. Añadir 1 volumen (gota) de la suspensión celular a 2 volúmenes (gotas) del reactivo antiglobulina. Centrifugar durante 10-60 s. Consultar las instrucciones del fabricante del reactivo para los detalles específicos.

Examinar si se ha producido aglutinación tras volver a suspender suavemente el botón de células. Un espejo cóncavo y una buena luz ayudarán en las lecturas macroscópicas. Si el resultado parece ser negativo, se debe confirmar microscópicamente.

Cada PAD o lote de pruebas debe ser cuidadosamente controlado como se ha descrito antes.

Comprobar los resultados negativos con la antiglobulina humana poliespecífica (AGH) o con reactivos anti-IgG, añadiendo células sensibilizadas a la IgG, y reactivos anti-C', con la adición de células recubiertas de complemento.

PAD utilizando la tecnología de aglutinación en columna

Una tarjeta con varios microtubos posibilita la prueba simultánea de múltiples muestras. Los microtubos contienen una matriz en fase sólida y el reactivo antiglobulina al que se añaden los hematíes del paciente. Durante la centrifugación, las células no aglutinadas pasan al extremo del tubo; sin embargo, las aglutinadas no pueden pasar a través del gel, que actúa como un tamiz. Como el reactivo antiglobulina ya se encuentra en los microtubos, no se necesita ni el lavado ni la adición de células recubiertas con IgG para las pruebas negativas. Remitirse a las instrucciones de cada fabricante para los detalles técnicos de realización de las pruebas.

Significado de la prueba de antiglobulina directa positiva

Una anemia con PAD positiva no significa necesariamente que el paciente tenga una anemia hemolítica autoinmune[2,3,11]. Las causas de una prueba positiva pueden ser las siguientes:

1. Un autoanticuerpo en la superficie eritrocitaria con o sin anemia hemolítica.
2. Un aloanticuerpo en la superficie eritrocitaria, como por ejemplo en la enfermedad hemolítica del recién nacido o tras una transfusión incompatible.
3. Anticuerpos provocados por fármacos adsorbidos sobre el eritrocito (v. pág. 220).
4. Globulinas normales adsorbidas sobre la superficie eritrocitaria resultantes del daño por fármacos (p. ej., algunas cefalosporinas).
5. Componentes del complemento aislados.
   a) Cerca del 10-11% de los pacientes con AHA por anticuerpos calientes tienen hematíes con PAD positiva como resultado del recubrimiento aislado con C3[12] (v. tabla 11.3).
   b) Enfermedad por hemaglutinina fría/hemoglobinuria paroxística por frío.
   c) Anemia hemolítica inmunitaria dependiente de fármacos (lisis inducida por el complemento).
   d) Adsorción de complejos inmunitarios sobre la superficie eritrocitaria. Éste puede ser el mecanismo de las (habitualmente débiles) reacciones que se encuentran en cerca del 8% de los pacientes hospitalizados por una amplia variedad de causas (v. más adelante).
6. Infusión pasiva de aloanticuerpos en el plasma/derivados del donante que reaccionan con los hematíes del receptor.

[a] A lo largo de este capítulo, «solución salina» quiere decir NaCl, 9 g/l tamponado a pH 7,0.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

a) Transfusión de plaquetas del grupo O con un título elevado anti-A,B a un receptor del grupo A o B.
b) La inmunoglobulina intravenosa puede contener anticuerpos ABO o anti-D[13].

En un estudio de pacientes tratados con inmunoglobulina intravenosa tras un trasplante de médula ósea, el 49% de los receptores desarrollaron una PAD positiva y el 25% mostraron positividad en la detección de anticuerpos (anti-A, -B, -D o -K pasivamente transfundidos) de corta duración (2-5 días).

7. Anticuerpos producidos por linfocitos pasajeros en el trasplante de órganos sólidos y en el trasplante de médula ósea[14,15].

   Los linfocitos pasajeros del donante producen anticuerpos dirigidos contra el ABO u otros antígenos en las células del receptor, originando una PAD positiva.
8. Unión inespecífica de inmunoglobulinas (no anticuerpos) a los hematíes en pacientes con hipergammaglobulinemia o con mieloma múltiple y en receptores de globulina antilinfocito y globulina antitimocito[16].

   Szymanski y cols.[17] utilizaron un AutoAnalyser y un Ficoll y PVP para favorecer la aglutinación con un suero anti-IgG altamente diluido (habitualmente 1:5.000) en albúmina de suero bovino al 0,5%. En este sensible sistema, la potencia de la aglutinación se correlacionó positivamente con la concentración de γ-globulina en el suero, siendo inferior a la normal en la hipogammaglobulinemia y superior a la normal en la hipergammaglobulinemia.

   Hallazgos similares se observaron en pacientes con mieloma múltiple. La unión inespecífica de la IgG con los hematíes se relacionó con el nivel de proteína monoclonal en el suero del paciente[18].

   Habitualmente, en los pacientes con hipergammaglobulinemia en los que la PAD es positiva, los intentos para demostrar los anticuerpos en los eluidos fracasan (es decir, los eluidos no son reactivos)[19,20].
9. Anticuerpos antifosfolípido, que reaccionan de forma cruzada, adsorbidos de forma inespecífica sobre la membrana del eritrocito y unidos a los epítopos fosfolípidos. Se ha documentado una PAD positiva como resultado de los anticuerpos antifosfolípido en pacientes con un síndrome antifosfolípido primario y con síndrome antifosfolípido en el lupus eritematoso sistémico[21]. También se ha descrito en donantes de sangre sanos[22].
10. Hallazgos fortuitos de PAD positiva sin una correlación clara entre la PAD y la anemia. Una PAD positiva es un hallazgo común en pacientes con anemia de células falciformes debido a las cantidades anómalas de IgG que recubren los hematíes. No hubo correlación entre la cantidad de IgG en los hematíes del paciente y la gravedad de la anemia[23].

    Hubo una asociación entre el nitrógeno ureico en sangre elevado y una PAD positiva. La urea puede alterar la membrana del eritrocito y favorecer la adsorción de IgG inespecífica[24].
11. Sensibilización *in vitro* si se utiliza una muestra que no contenga EDTA. Si, por ejemplo, se mantiene sangre coagulada o sangre normal desfibrinada en una nevera a 4 °C, o incluso a temperatura ambiente, y se realiza posteriormente la prueba de la antiglobulina, la reacción puede ser positiva debido a la adsorción de anticuerpos fríos incompletos y de complemento procedentes del suero normal[4b]. Las muestras de sangre recogida en EDTA o en ACD y enfriadas posteriormente no dan este tipo de resultados falsamente positivos porque el anticoagulante inhibe la reacción de complemento.
12. La aglutinación falsamente positiva puede ocurrir con un gel de sílice obtenido del vidrio[25]. También, aunque raramente, la PAD ha sido positiva con la sangre de individuos en un aparentemente perfecto estado de salud (p. ej., donantes de sangre). Tales sucesos no se han explicado satisfactoriamente (v. más adelante).

PAD positiva en sujetos normales

La aparición de una PAD claramente positiva en un sujeto aparentemente sano es un fenómeno infrecuente, aunque bien conocido. Worlledge[11] notificó una prevalencia en donantes de sangre de aproximadamente 1 por cada 9.000. En un informe posterior, Gorst y cols.[26] estimaron que la prevalencia era de alrededor de 1 por cada 14.000 con una probabilidad creciente de obtener una positividad en la prueba al aumentar la edad del paciente. Su informe, y los informes sucesivos[17,27], constatan que, por lo general, el hallazgo de una PAD positiva utilizando un suero anti-IgG en una persona aparentemente sana tiene poca importancia clínica, y que es muy poco frecuente que posteriormente se pueda desarrollar una AHA patente. En algunos de estos individuos, la PAD finalmente se negativiza.

PAD positiva en pacientes hospitalizados

En contraste con la rareza de la PAD positiva en personas sanas, la positividad de las pruebas es mucho más frecuente en los pacientes hospitalizados. Worlledge[11] notificó que los hematíes en 40 de 489 muestras sanguíneas (8,9%) sobre las que se hicieron pruebas rutinarias se aglutinaron con el suero anti-C'. Una única muestra se aglutinó con un suero anti-IgG y ésta se obtuvo de un paciente en tratamiento con α-metildopa. Freedman[28] notificó una incidencia similar (7,8% de pruebas positivas con suero anti-C'). Lau y cols.[29] utilizaron únicamente suero anti-IgG. Las pruebas fueron positivas en contadas ocasiones (0,9% positivas de 4.664 pruebas). La explicación más probable para la relativamente elevada incidencia de pruebas positivas con el suero anti-C' es que la reacción se produce entre los anticuerpos anti-C' y los inmunocomplejos adsorbidos por los hematíes.

Resultados falsamente negativos de las pruebas antiglobulina

Hay diversas causas de resultados falsamente negativos de las pruebas:

1. Lavado inadecuado de hematíes; los antisueros pueden ser neutralizados por inmunoglobulinas o complemento en el suero o en el plasma circundante (v. pág. 431).

2. Agitación excesiva en la fase de lectura; esto puede desagregar la aglutinación conduciendo a un resultado falso negativo.
3. Uso de antisueros con escasa potencia, por lo que no se detectan las células con una sensibilización débil.
4. Uso de antisueros a los que les falta el anticuerpo correspondiente a la subclase de inmunoglobulina responsable de la sensibilización del eritrocito.
5. Presencia de un anticuerpo fácilmente disociable y que se extrae con solventes en el proceso de lavado.

Estos fenómenos se evitan en gran medida con el uso de la tecnología de aglutinación en columna.

Anemia hemolítica autoinmune con PAD negativa

La mayoría de los bancos de sangre de los hospitales utilizan reactivo de AGH multiespecífico de «amplio espectro» para la detección y el diagnóstico de la AHA. Estos reactivos contienen anticuerpo contra la IgG humana y contra el componente C3d del complemento humano y, además, tienen poca actividad contra las proteínas IgA e IgM. Se ha notificado que la incidencia de la AHA por IgA caliente sola es del 0,2 al 2,7%[30] y se puede errar en el diagnóstico si se utiliza esta AGH multiespecífica para la detección con la PAD. En aproximadamente el 2-6% de los pacientes que presentan las características clínicas y hematológicas de AHA, la PAD se mantiene negativa al repetir las pruebas[11,31,32].

Los autoanticuerpos IgG de baja afinidad se disocian de los hematíes durante la fase de lavado si se utiliza una técnica de tubo, dando lugar a una PAD negativa. Por otra parte, es posible que sólo haya unas pocas moléculas de IgG recubriendo los hematíes y que esta cantidad esté por debajo del umbral de detección, que es de 300-4.000 moléculas por eritrocito si se utiliza una técnica de tubo. En tales casos, la PAD positiva puede demostrarse mediante una técnica más sensible, como es el método de aglutinación en columna, el análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas o la citometría de flujo[33-35].

Si se utiliza la AGH multiespecífica y la PAD sigue siendo negativa con evidencia clínica de hemólisis, se debe utilizar una técnica más sensible para los exámenes siguientes.

Se puede utilizar la PAD en tarjeta con gel DiaMed, que contiene un conjunto de reactivos AGH monoespecífico (es decir, anti-IgG, -IgA, -IgM, -C3c, -C3d y un control inerte). Dado que no hay fase de lavado, se posibilita la detección de los anticuerpos IgG, IgA e IgM de baja afinidad. Una tarjeta con gel puede también detectar la infrecuente anemia hemolítica autoinmune por IgA sola.

Preparación y prueba de un eluido concentrado

La técnica del eluido concentra los bajos niveles de inmunoglobulina presentes en la superficie eritrocitaria, de forma que el anticuerpo puede ser detectado al evaluar el eluido con hematíes del grupo O por medio de la PAI. Las técnicas de elución invierten o neutralizan las fuerzas de unión que existen entre los antígenos eritrocitarios y el anticuerpo que recubre las células. Esto puede conseguirse con varias técnicas (p. ej., calor, alteraciones del pH, etc.).

Prueba del polibreno directo manual

El siguiente método[36] es una modificación del de Lalezari y Jiang[37]. El polibreno es una molécula catiónica polivalente (bromuro de hexadimetrina) que puede superar las fuerzas electrostáticas repelentes entre los hematíes adyacentes, juntando aún más a las células. Cuando los niveles de IgG en la superficie eritrocitaria son bajos, el polibreno potencia la unión por anticuerpos de los hematíes adyacentes. Después, el polibreno se neutraliza utilizando una molécula cargada negativamente como el citrato trisódico. Los hematíes sensibilizados se mantienen aglutinados tras la neutralización del polibreno. Los hematíes no sensibilizados se separarán tras la neutralización.

Reactivos

Solución madre de polibreno. Polibreno al 10% en NaCl, 9 g/l a pH 6,9 (solución salina).

Solución de trabajo de polibreno. Diluir la solución madre de polibreno en solución salina al 1:250.

Solución de resuspensión. 60 ml de citrato trisódico, 0,2 mol/l, añadidos a 40 ml de dextrosa, 50 g/l.

Solución de lavado. 50 ml de citrato trisódico, 0,2 mol/l, en 950 ml de solución salina.

Medio con baja fuerza iónica. 50 g/l de dextrosa que contenga 2 g/l de tetraacetato disódico de etilendiamina. Ajustar el pH de la mitad del lote a 6,4. Almacenar el resto a su pH original (aproximadamente 4,9); utilizar este último para repetir las pruebas con resultado negativo al utilizar el medio con baja fuerza iónica a pH 6,4.

Método

Confirmar que todos los reactivos estén a temperatura ambiente.

Control positivo

Diluir una IgG anti-D en suero normal del grupo AB. Encontrar una dilución que dé un resultado positivo con células papainizadas pero que sea negativo en la PAI al hacer una prueba estándar con los hematíes D positivo del grupo O (la dilución al 1:10.000 suele ser la adecuada).

Control negativo

Suero normal del grupo AB que no aglutina hematíes Rh D positivo del grupo O papainizados.

1. Lavar las células cuatro veces en solución salina y preparar suspensiones al 3-5% en solución salina de los hematíes RhD del grupo O normales y de prueba.
2. Disponer tres tubos de 75 × 10 mm como se muestra en la tabla 11.6. Dejarlos a temperatura ambiente durante 1 min.
3. Añadir 1 gota de la solución de trabajo de polibreno a cada tubo y mezclarlo suavemente. Dejarlos durante 15 s a temperatura ambiente.
4. Centrifugar durante 10 s a 1.000 g. Decantar, teniendo cuidado de eliminar todo el sobrenadante.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 11.6. Realización de una prueba del polibreno directo manual

	Prueba	Control positivo	Control negativo
Suero AB[a]	2	0	2
Diluir el anti-D en el suero AB[a]	0	2	0
3-5% de células de prueba[a]	1	0	0
3-5% de células (D) Rh O normal[a]	0	1	1
Medio iónico bajo	0,6 ml	0,6 ml	0,6 ml

[a] Gotas.

5. Dejar durante 3-5 min a temperatura ambiente antes de añadir 2 gotas de la solución de resuspensión y mezclarla suavemente. Antes de los 10 s los conglomerados se disociarán dejando la verdadera aglutinación en los tubos positivos.
6. Leer macroscópicamente a los 10-60 s. Comprobar todos los resultados negativos con el microscopio y compararlos con el control negativo.
7. Repetir las pruebas negativas utilizando el medio con baja fuerza iónica al pH inferior (alrededor de 4,9).

Si la prueba del polibreno directo es negativa, se puede realizar una prueba suplementaria con antiglobulina lavando las células dos veces en la solución de lavado y enfrentándolas a un reactivo con antiglobulina anti-IgG.

Determinación del grupo sanguíneo de un paciente con AHA

Tipificación ABO

No debería haber ninguna dificultad para tipar, según su ABO, a los pacientes con una AHA de tipo caliente utilizando reactivos monoclonales, pero la presencia de aglutininas frías puede causar algún inconveniente. Hay que lavar siempre las células en solución salina caliente (37 °C). En ese momento debería poder hacerse la tipificación sin mayor problema; no obstante, las reacciones deben controlarse con suero AB normal. Hay que realizar la tipificación inversa estrictamente a 37 °C. Calentar las células con los grupos A_1, B y O conocidos a 37 °C antes de añadirlas al suero del paciente a 37 °C. Leer los resultados macroscópicamente.

Tipificación Rh D

Cuando la PAD es positiva, se deben utilizar los reactivos anti-D monoclonales; si hay aglutininas frías, se realizará la prueba a 37 °C. Hay que incluir los controles apropiados (v. pág. 452).

Demostración de los anticuerpos libres en el suero

El suero de los pacientes con AHA contiene frecuentemente autoanticuerpos libres. Sin embargo, puede encontrarse autoanticuerpo libre sin que haya hemólisis. Como resultado de la mejora en la sensibilidad del reactivo, cualquier anticuerpo fijador de complemento y de IgG clínicamente significativo podrá ser detectado por los métodos actuales de detección de anticuerpos.

Identificación mediante técnicas de adsorción de los aloanticuerpos coexistentes en presencia de autoanticuerpos calientes

Las técnicas de adsorción para la detección de los aloanticuerpos presentes en el suero o en los eluidos de los pacientes con sospecha de AHA, o con AHA demostrada, pueden ser útiles en las siguientes situaciones:

1. Para la detección de aloanticuerpos coexistentes en pacientes con AHA que hayan estado embarazadas o a quienes se haya practicado una transfusión con anterioridad, y se les encuentre un anticuerpo panreactivo en el suero.
2. Para la diferenciación entre los autoanticuerpos y los aloanticuerpos en el eluido de los pacientes recientemente transfundidos con AHA.
3. Para la investigación de las reacciones hemolíticas transfusionales debidas a los aloanticuerpos eritrocitarios en pacientes con AHA.

En algunos casos de AHA, se puede detectar un aloanticuerpo subyacente titulando el suero del paciente y el eluido contra un panel de hematíes previamente fenotipados. Sin embargo, un título elevado de autoanticuerpo puede enmascarar al aloanticuerpo; de aquí la necesidad de las técnicas de adsorción, sobre todo en las situaciones indicadas anteriormente.

Utilización del reactivo ZZAP en las técnicas de autoadsorción

El reactivo ZZAP es una mezcla de ditiotreitol y papaína[38]. Disocia un autoanticuerpo que esté recubriendo a los hematíes del paciente y los trata con la enzima, incrementando así la cantidad de autoanticuerpo que puede ser posteriormente absorbido por las células del paciente *in vitro*.

Reactivos

Ditiotreitol (DTT), 0,2 mol/l.
Papaína, 1%.
Solución salina tamponada con fosfato (PBS), a pH 6,8-7,2.

Preparar un volumen adecuado de ZZAP mezclando los reactivos en la siguiente proporción: 5 volúmenes de DTT, 0,2 mol/l, y 1 volumen de papaína al 1%.

Comprobar el pH y ajustarlo a 6,0-6,5 utilizando una gota cada vez de HCl, 0,2 mol/l o de NaOH, 0,2 mol/l.

Método

1. Añadir 2 volúmenes de ZZAP a 1 volumen de concentrado de hematíes que hayan sido lavados cuatro veces.

Incubar a 37 °C durante 30 min mezclándolos ocasionalmente.
2. Tras la incubación, lavar las células cuatro veces en solución salina, centrifugándolas intensamente tras el último lavado.
3. Dividir las células en dos volúmenes iguales. En uno de ellos, añadir un volumen igual del suero a adsorber. Incubar a 37 °C durante 1 h.
4. Centrifugar a 1.000 g. Eliminar el suero y añadirlo al volumen de células restante.
5. Repetir el procedimiento de adsorción.
6. Eliminar el suero adsorbido y almacenar a –20 °C o a temperatura inferior para la detección de los aloanticuerpos o para las pruebas cruzadas, que pueden realizarse con las técnicas estándar.

Notas

Las técnicas de autoadsorción sólo deben utilizarse en las siguientes circunstancias:

1. Cuando el paciente no haya sido transfundido en los 3 meses anteriores, porque la presencia de hematíes transfundidos puede posibilitar la adsorción de aloanticuerpos así como de autoanticuerpos
2. Cuando se disponga de al menos 2-3 ml de concentrado de hematíes del paciente.
3. Cuando los autoanticuerpos presentes reaccionen bien con los hematíes tratados con enzima. Si no lo hacen, el tratamiento con ZZAP se debe reemplazar por la elución en caliente. La elución en caliente puede realizarse agitando las células lavadas durante 5 min en un baño María a 56 °C y lavando posteriormente las células.

Aloadsorción utilizando células papainizadas R_1R_1, R_2R_2 y rr

El método de aloadsorción utilizando células papainizadas R_1R_1, R_2R_2, y rr puede utilizarse cuando la autoadsorción no es adecuada: por ejemplo, cuando el paciente ha recibido una transfusión en los 3 meses previos o cuando disponemos de menos de 2-3 ml de los hematíes del paciente.

1. Seleccionar células de detección de anticuerpos de tres grupos O, a las que individualmente les falte alguno de los antígenos del grupo sanguíneo que estimulan corrientemente la producción de los anticuerpos con importancia clínica (p. ej., c, e, C, E, K, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S, s) (tabla 11.7).
2. Papainizar 2 ml de concentrado de hematíes de cada muestra después de lavar cuatro veces las células en solución salina.
3. Añadir 1 ml del suero del paciente a 1 ml de cada muestra de células papainizadas, lavadas y concentradas. Incubar durante 20 min a 37 °C.
4. Centrifugar para concentrar las células. Eliminar el suero sobrenadante y añadirlo al segundo volumen de 1 ml de células papainizadas. Incubar durante 1 h a 37 °C.
5. Centrifugar de nuevo para concentrar las células. Eliminar el sobrenadante y almacenar a –20 °C o a temperatura inferior para pruebas posteriores (p. ej., detección de aloanticuerpos y pruebas de histocompatibilidad cruzada).

Método para probar los sueros aloadsorbidos

Para la detección de los aloanticuerpos, cada suero adsorbido se prueba contra un panel de hematíes fenotipados mediante una PAI. Para la prueba de histocompatibilidad cruzada, cada suero adsorbido debe probarse de forma separada contra los hematíes del donante mediante una PAI, utilizando suero no diluido.

Ejemplo de la detección de aloanticuerpos utilizando la técnica de aloadsorción en un paciente recientemente transfundido con AHA

La primera vez que se probó el suero del paciente contra un panel de hematíes fenotipados del grupo O únicamente puso de manifiesto los anticuerpos panreactivos. En cambio, se demostró que los tres sueros adsorbidos, A, B y C, obtenidos adsorbiendo el suero del paciente con tres muestras de hematíes del grupo O con fenotipo seleccionado, contenían anti-E y anti-Jk^a al probarlas contra un panel de células del grupo O fenotipadas utilizando la PAI. Los resultados de probar los sueros adsorbidos A, B y C se muestran en la tabla 11.7. El fenotipo de los hematíes del paciente era R_1r Jk (a–b–).

Explicación de los resultados de probar los sueros aloadsorbidos A, B y C

1. Dado que las células adsorbentes R_1R_1 eran negativas para los antígenos E y Jk^a, el suero adsorbido A podría contener anti-E y anti-Jk^a. La prueba del suero adsorbido A contra el panel de células indicaba que ésta era la situación.
2. Dado que las células adsorbentes R_2R_2 eran positivas para el antígeno E pero negativas para el antígeno Jk^a, el suero adsorbido B podría contener anti-Jk^a, pero no anti-E. La prueba del suero adsorbido A contra el panel de células confirmó la presencia de anti-Jk^a.
3. Dado que las células adsorbentes rr eran negativas para el antígeno E pero positivas para el antígeno Jk^a, el suero adsorbido C podría contener anti-E, pero no anti-Jk^a. La prueba del suero adsorbido C contra el panel de células confirmó la presencia de anti-E.
4. Dado que el fenotipo de los hematíes propios del paciente era R_1r, Jk (a–b–), los anti-E y anti-Jk^a detectados en los sueros aloadsorbidos debían ser aloanticuerpos. La sangre para transfusión debería ser E-negativa, Jk^a-negativa.

Notas adicionales sobre las técnicas de adsorción

1. Si el paciente ha recibido una transfusión en el último mes, se debe probar también un eluido porque puede haber aloanticuerpos presentes en los hematíes aunque no estén en el suero/plasma.
2. Si el suero del paciente contiene un anticuerpo hemolítico, hay que añadir EDTA para impedir la captación del complemento y la lisis consecutiva de las células utili-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 11.7. Prueba de un suero aloabsorbido contra un panel de hematíes fenotipados

	Fenotipos eritrocitarios															Resultados de la PAI		
N.º	Rh	M	N	S	s	P_1	Lu_a	Le_a	Le_b	K	Kp_a	Fy_a	Fy_b	Jk_a	Jk_b	Suero A	Suero B	Suero C
1.	R_1R_1	+	+	+	+	+	–	–	–	+	–	+	+	+	+	1+	1+	–
2.	R_1R_1	+	–	–	+	–	+	–	+	–	–	+	+	+	+	1+	3+	–
3.	R_2R_2	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	+	–	+	1+	–	3+
4.	R_1R_2	+	+	+	–	+	–	–	+	–	–	–	+	+	–	1+	4+	1+
5.	r′r	+	–	+	+	+	–	–	+	–	–	+	+	–	+	–	–	–
6.	r′′r	+	+	+	–	+	–	–	+	–	–	+	–	+	+	2+	2+	2+
7.	rr	+	+	–	+	+	–	–	–	+	–	+	+	+	–	2+	2+	–
8.	rr	+	–	+	+	+	–	+	–	–	–	+	–	+	–	1+	2+	(+)
9.	rr	–	+	–	+	+	–	+	–	–	+	+	+	+	+	2+	2+	–
10.	R_1R_2	–	+	+	+	–	–	–	+	+	–	–	+	+	–	1+	3+	2+

Fenotipo de células seleccionadas para la absorción del suero						Suero absorbido
1. R_1R_1,	C^w +,	K –,	Fy(a + b –),	Jk(a – b +),	M +, N –,s –	Suero A
2. R_2R_2,	C^w–,	K–	Fy (a – b +),	Jk(a – b +),	M +, N +, s +	Suero B
3. rr,	C^w	K+	Fy(a + b –),	Jk(a + b –),	M +, N –, s –	Suero C

PAI, prueba de la antiglobulina indirecta.

zadas para la adsorción. Añadir 1 volumen de EDTA neutro (sal de potasio) (v. pág. 588) a 9 volúmenes de suero. Habitualmente, se utiliza una muestra de plasma.
3. A menudo, es útil aloadsorber tanto el suero como el eluido para diferenciar entre los autoanticuerpos y los aloanticuerpos, sobre todo si el autoanticuerpo es del tipo imitador descrito por Issitt[9].
4. Si el anticuerpo no reacciona con las células papainizadas, *no* papainizar las células para la adsorción.

Elución de anticuerpos a partir de los hematíes

La selección de cualquier técnica de elución se basa a menudo en la preferencia personal y en la disponibilidad de los reactivos y del equipamiento necesarios. Sin embargo, las técnicas de elución calientes se utilizan más para la elución de los anticuerpos (IgM) primarios de reacción al frío, como los anti-A, anti-N, anti-M, anti-I, y los anticuerpos IgG anti-A y anti-B asociados con la enfermedad hemolítica ABO del recién nacido (EHRN). La técnica de congelación y descongelación de Lui (v. más adelante) puede utilizarse también para la investigación de la EHRN ABO. Igualmente eficaces son los equipos preparados existentes en el mercado que alteran el pH de los hematíes y soslayan los riesgos de utilizar solventes orgánicos. Remitirse a las instrucciones del fabricante para más detalles. Los métodos de la elución caliente y las técnicas de elución de Lui se describen a continuación. En la actualidad, existen en el mercado muchos equipos disponibles.

Notas

1. Se requiere una gran cantidad de hematíes para obtener un eluido suficiente para las pruebas.
2. Los hematíes deben lavarse al menos 6 veces y el último lavado conservarse para hacer pruebas que aseguren la eliminación de todos los anticuerpos libres.
3. Dependiendo de la técnica de elución utilizada, el eluido preparado puede congelarse si la realización de la prueba no es posible inmediatamente después de su preparación.

Elución caliente[39]

Mezclar volúmenes iguales de concentrados de hematíes lavados y de solución salina o de albúmina de suero bovino (ASB) al 6%. Incubar a 56 °C durante 5 min. Agitar periódicamente. Centrifugar para concentrar los hematíes. Eliminar el sobrenadante (el eluido), que puede estar teñido con hemoglobina. Probar el eluido con las técnicas apropiadas, en paralelo con el último lavado de los hematíes.

Elución por congelación y descongelación (Lui)[40]

Mezclar 0,5 ml de concentrado de hematíes lavados con 3 gotas de PBS o de suero AB. Taponar el tubo y rotarlo para recubrir la superficie de vidrio con hematíes. Dejarlo a –20 °C durante 10 min. Descongelar rápidamente los hematíes en un baño María a 37 °C. Quitar el tapón y centrifugar para sedimentar la estroma eritrocitaria. Eliminar el sobrenadante y probarlo en paralelo con el último lavado de los hematíes con las técnicas adecuadas.

Detección de eluidos

El eluido y la solución salina del último lavado (control) se filtran primero contra dos o tres muestras de células lavadas del grupo O normal para ver si contienen algún anticuerpo por medio de una PAI. Si se sospecha la presencia de un anti-A o un anti-B, incluir células A_1 y B. Añadir a 4-6 gotas del eluido y del control, 2 gotas de una suspensión al 2% mediante un medio de solución salina de fuerza iónica normal (NISS).

Incubar durante 1-1,5 h a 37 °C. Lavar cuatro veces y, utilizando diluciones óptimas de anti-IgG, realizar la PAI mediante el método del tubo.

Si la preparación de control (el sobrenadante solución salina del último lavado) da reacciones positivas, se debe considerar la posibilidad de que un eluido contenga anticuerpo sérico.

Determinación de la especificidad de los autoanticuerpos calientes en los eluidos y en los sueros

Cuando se prueban contra un panel fenotipado, cerca de dos tercios de los autoanticuerpos parecen tener una especificidad Rh y, en cerca de la mitad de estos casos, se puede demostrar la especificidad contra un antígeno particular[2,6,9]. Dentro del sistema Rh, la especificidad más habitual es la del tipo anti-e. Las células D - - y Rh_{null} son más ventajosas.

El otro tercio de los autoanticuerpos puede mostrar especificidad contra otros antígenos de incidencia elevada (p. ej., Wr^b y En^a), mientras que raramente están implicadas las especificidades contra otros grupos sanguíneos. Es esencial diferenciar entre autoanticuerpos y aloanticuerpos, sobre todo si se está considerando una transfusión. La presencia de aloanticuerpos además de autoanticuerpos viene sugerida por cualquier discrepancia entre los resultados del suero y del eluido.

Como ya se ha mencionado, la presencia de aloanticuerpos en un suero complica la determinación de la especificidad de un autoanticuerpo; podría argumentarse que sería mejor probar únicamente el autoanticuerpo eluido y dejar estrictamente el suero solo. Sin embargo, puede que sólo dispongamos de una pequeña cantidad de eluido, sobre todo en pacientes anémicos y es, generalmente, más recomendable probar tanto el suero como el eluido. El procedimiento es el mismo para ambos.

Titulación de los anticuerpos calientes en los eluidos o en los sueros

Los métodos que se utilizan son los que se describen en el capítulo 19. La técnica exacta elegida y los hematíes utilizados deben ser aquellos que han dado los resultados más claros en las pruebas de detección. La titulación del eluido puede ser de utilidad en presencia de un autoanticuerpo panreactivo para excluir un aloanticuerpo subyacente.

Algunas veces, al investigar los autoanticuerpos fríos, las siguientes pruebas pueden proporcionar una información clínicamente útil:

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Determinación de la especificidad de los autoanticuerpos fríos

Los autoanticuerpos fríos en título elevado tienen una especificidad de grupo sanguíneo bien definida, la cual se encuentra a menudo dentro del sistema I/i[9,41,42]. Dado que el antígeno I está escasamente desarrollado en los hematíes del cordón umbilical, mientras que el antígeno i presenta un buen desarrollo, hay que incluir los hematíes del grupo O del cordón umbilical en el panel utilizado para probar la especificidad I/i. Las células adultas tienen casi siempre el antígeno I bien expresado, pero la potencia del antígeno varía, y constituye una ventaja considerable disponer de células adultas que sabemos que poseen un antígeno I fuerte. (Si disponemos de las poco frecuentes células adultas con antígeno i, podemos también utilizarlas.)

Titulación de los anticuerpos fríos

Si la prueba de detección es positiva para las aglutininas frías, hay que titularlas de la siguiente forma.

Preparar soluciones por duplicado del suero en solución salina que vayan desde 1:1 a 1:512, y depositar una gota de cada dilución sérica en tres series de tubos (12 × 75 mm), de forma que se puedan hacer tres titulaciones replicadas. Añadir 1 gota de una suspensión al 2% de células (I) de adulto combinadas del grupo O lavadas en solución salina a la primera fila, 1 gota de células (i) del grupo O del cordón umbilical a la segunda fila y 1 gota de las propias células del paciente a la tercera fila. Mezclar y dejarlas durante varias horas a 4 °C. Antes de leer, colocar las pipetas y una bandeja de portaobjetos a 4 °C. Leer macroscópicamente a temperatura ambiente utilizando los portaobjetos enfriados.

Intervalo de normalidad

Utilizando sueros de adultos normales de raza blanca y hematíes I de adulto normales, encontraremos el título de aglutininas frías a 4 °C entre 1 y 32; con células (i) del cordón umbilical el título se sitúa entre 0 y 8. En la CHAD crónica, es posible que el criterio de valoración no se alcance a la dilución de 1:512; si éste es el caso, se deben preparar y probar diluciones mayores.

Si existe una aglutinina fría a un título elevado, hay que excluir la presencia de un aloanticuerpo frío. En este caso, se observará que las propias células del paciente reaccionan mucho menos intensamente que las células I de adulto normales (tabla 11.8).

Patrones de titulación de las aglutininas frías

La presencia de aglutininas frías a título elevado en el suero de un paciente vendrá indicada por el procedimiento de detección descrito anteriormente. Para demostrar que las aglutininas son autoanticuerpos, es necesario demostrar que las propias células del paciente también se aglutinan. El título que se obtiene utilizando las células del paciente es habitualmente inferior (la mitad o la cuarta parte) que el de las células de adulto normales utilizadas como control (tabla 11.8).

En la CHAD, ya sea «idiopática» o secundaria a una neumonía por micoplasma o a un linfoma, los autoanticuerpos tienen habitualmente una especificidad anti-I (paciente A.G. en la tabla 11.8).

En los casos raros de anemia hemolítica asociada con mononucleosis infecciosa, se ha evidenciado un autoanticuerpo con especificidad anti-i (paciente F.B. en la tabla 11.8) y también se ha encontrado esta especificidad en ciertos pacientes con linfoma. Pocas veces se ha observado en la CHAD que el anticuerpo tenga especificidad anti-Pr o anti-M: si se utilizan hematíes tratados con enzimas, en cualquiera de los dos casos el antígeno es destruido por el tratamiento enzimático (paciente A.R. en la tabla 11.8).

Determinación del intervalo térmico de las aglutininas frías

A partir de una serie de diluciones base duplicadas de suero en solución salina, colocar 1 gota de suero o de la dilución sérica en tres filas de tubos (12 × 75 mm). Dejarlos a 30 °C y a temperatura ambiente (20-25 °C); añadir en cada tubo 1 gota de una suspensión de solución salina al 2% de las siguientes células:

1. Hematíes combinados del grupo O (I) de adulto normales.
2 Hematíes combinados del grupo O (i) de cordón umbilical.
3. Hematíes del paciente.

Tabla 11.8. Títulos de aglutinación utilizando diversos tipos de autoanticuerpos fríos y hematíes de adulto normal y del cordón umbilical, hematíes del paciente y hematíes de adulto normal tratados con enzimas (papainizados)

Paciente	Título de aglutinación (4 °C)			
	Células (I) de adulto	Células (i) del cordón	Células del paciente	Células (I) de adulto papainizadas
A.G.	4.000	512	2.000	8.000
F.B.	512	32.000	128	8.000
A.R.	2.000	2.000	2.000	16

A.G. Este paciente tenía enfermedad por hemaglutininas frías crónica. El anticuerpo era del tipo anti-I habitual.
F.B. Este paciente tenía anemia hemolítica asociada con un linfoma. El anticuerpo era del tipo anti-i.
A.R. Este paciente tenía enfermedad por hemaglutininas frías crónica. El anticuerpo era del poco frecuente tipo anti-Pr.

Si se produce aglutinación a 37 °C, hay que hacer la titulación también a esta temperatura en las pruebas de detección. Tras la incubación a la temperatura apropiada durante 1 h, determinar la presencia o la ausencia macroscópica de aglutinación sobre un foco luminoso.

Detección y titulación del anticuerpo de Donath-Landsteiner

El anticuerpo D-L de la HPF difiere de los anticuerpos fríos en títulos elevados, a los que nos hemos referido previamente, en que se trata de un anticuerpo IgG y tiene una especificidad bastante diferente. Produce incluso mucha más lisis en las células normales en relación con su titulación que los anticuerpos anti-I o los anti-i. El título de lisis de un anticuerpo D-L puede ser igual o superior que su título de aglutinación. Casi siempre la lisis máxima se desarrolla en un suero no acidificado.

Prueba directa de Donath-Landsteiner

Recoger dos muestras de sangre venosa en tubos sin anticoagulante, calentados previamente a 37 °C. Incubar la primera muestra a 37 °C durante 1,5 h. Poner la segunda muestra en una cubeta con hielo y dejarla durante 1 h; después colocar este tubo a 37 °C durante otros 20 min. Centrifugar ambos tubos a 37 °C y examinar el suero sobrenadante en busca de lisis. La prueba positiva la indica la lisis en la muestra que ha sido enfriada. Si es positiva, investigar la especificidad del anticuerpo (como se describe más adelante). Si es negativa, realizar una prueba indirecta de Donath-Landsteiner.

Un resultado falso positivo de la prueba directa de Donath-Landsteiner no es infrecuente por varias razones:

1. Bajo nivel de anticuerpos.
2. Bajo nivel de complemento (el complemento se consume durante el proceso hemolítico).
3. Presencia de C3dg en los hematíes del paciente (no conduce a una hemólisis mediada por complemento).

Esto puede superarse realizando una prueba indirecta de Donath-Landsteiner.

Prueba indirecta de Donath-Landsteiner

Se utiliza el suero obtenido de la sangre del paciente que se ha dejado coagular a 37 °C. Añadir 1 volumen de una suspensión al 50% de hematíes lavados P-positivo del grupo O normal a 9 volúmenes de suero no acidificado del paciente en un tubo. Enfriar la suspensión en hielo picado a 0 °C durante 1 h; después calentar el tubo a 37 °C durante 30 min. Centrifugar a 37 °C y examinarlo en busca de lisis. Hay que establecer tres controles en el mismo momento:

1. Un duplicado de la suspensión suero-células en prueba pero mantenido estrictamente a 37 °C durante la duración de la prueba.
2. Un duplicado de la suspensión suero-células en prueba, exceptuando que primero se añade un volumen igual de suero fresco normal ABO compatible al suero del paciente como fuente de complemento. Se añade un volumen de la suspensión de células al 50% y se enfría la suspensión para posteriormente calentarla de la misma forma que la suspensión prueba. (Este control excluye resultados falsos negativos debidos a que el suero del paciente sea deficitario en complemento.)
3. Un duplicado de la suspensión suero-células en prueba, exceptuando que se utiliza suero fresco normal en lugar del suero del paciente. Este control es también enfriado y posteriormente calentado.

La positividad de la prueba vendrá indicada por la lisis en la suspensión de prueba y en el control n.º 2. Si disponemos de células *pp* ABO compatibles, deben utilizarse en un juego de tubos duplicado. No se producirá ninguna lisis, lo que confirmará la especificidad P del anticuerpo.

Se puede producir una prueba indirecta de Donath-Landsteiner falsamente negativa. Se debe a la presencia de globósido en el suero añadido como fuente de complemento. El globósido es el glucolípido de la membrana eritrocitaria más abundante y está presente en el suero de todos los individuos P+. La adición de suero fresco ABO compatible como fuente de complemento podría originar una reacción cruzada con el anti-P, y esto producir una prueba indirecta de Donath-Landsteiner falsamente negativa. Por tanto, la prueba indirecta de Donath-Landsteiner[43] puede modificarse en dos etapas.

Prueba indirecta de Donath-Landsteiner en dos etapas

El suero fresco ABO compatible se añade únicamente a la suspensión suero-eritrocito tras la hora inicial de incubación a 0 °C. Esto impide la inhibición del anticuerpo durante la fase fría y permite la sensibilización máxima de los hematíes[44].

Otra causa posible de un falso negativo de la prueba indirecta de Donath-Landsteiner es un bajo nivel de anticuerpos. El tratamiento con papaína de los hematíes expondrá el antígeno P y puede favorecer la sensibilización[43].

Titulación de un anticuerpo de Donath-Landsteiner

Preparar diluciones dobles o cuádruples del suero del paciente en suero fresco humano normal. Añadir a cada tubo la décima parte del volumen de una suspensión al 50% de hematíes lavados P-positivo del grupo O e introducir cada uno de los tubos en hielo picado a 0 °C. Después de 1 h, colocarlos en un incubador a 37 °C durante otros 30 min. Después centrifugar y examinarlos en busca de lisis.

Detección de un anticuerpo de Donath-Landsteiner mediante la prueba de la antiglobulina indirecta

Dado que el anticuerpo D-L es un anticuerpo IgG, puede detectarse con la PAI utilizando un suero anti-IgG si las células que se han expuesto al anticuerpo en frío se lavan en solución salina fría (4 °C). A esta temperatura, el anticuerpo no se eluirá durante el lavado. Hay que recordar, no obstante, que la exposición de los hematíes normales a 4 °C a muchos sueros normales frescos producirá una PAI positiva con sueros antiglobulina de amplio espectro debido a

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

la adsorción de anti-H incompleta (un anticuerpo frío de presentación habitual) por parte de los hematíes. A baja temperatura, el complemento también se une y es esta adsorción la que da lugar a la positividad de las pruebas con sueros de amplio espectro. La adsorción del complemento puede evitarse con la adición de un agente quelante, como el EDTA, al suero.

Método

Añadir la décima parte de un volumen de EDTA, tamponado a pH 7,0 (v. pág. 588) al suero del paciente. Preparar diluciones por duplicado en solución salina desde 1:1 hasta 1:28.

Añadir 1 volumen (gota) de una suspensión al 50% de hematíes P-positivo del grupo O a 10 volúmenes (gotas) de cada dilución. Mezclar y enfriar a 4 °C (preferiblemente en una habitación fría).

Después de 1 h, lavar cuatro veces los hematíes en un volumen grande de solución salina fría (4 °C). Después, realizar una prueba antiglobulina utilizando un reactivo anti-IgG, como se describe en la página 452, pero conservando la suspensión de suero antiglobulina-hematíes a 4 °C.

Como controles, preparar una serie de pruebas utilizando un suero que se sepa que contiene un anticuerpo D-L (si se dispone de él) y un suero normal respectivamente.

Esta técnica es la forma más sensible de detectar, sobre todo en los sueros almacenados, la presencia de un anticuerpo D-L en una cantidad insuficiente para ocasionar una lisis real.

Intervalo térmico del anticuerpo de Donath-Landsteiner

La temperatura más elevada a la cual los hematíes adsorben habitualmente los anticuerpos D-L está alrededor de los 18 °C. Por consiguiente, poca o ninguna lisis puede esperarse a menos que la suspensión de células-suero se enfríe por debajo de esta temperatura. El enfriamiento en hielo picado produce una adsorción máxima del anticuerpo y ocasiona la unión del complemento, que desencadena la lisis cuando la suspensión de células se calienta posteriormente a 37 °C. De aquí que el procedimiento «frío-caliente» bifásico necesario para la lisis se demuestre con un anticuerpo D-L típico.

Especificidad del anticuerpo de Donath-Landsteiner

El anticuerpo D-L parece tener una especificidad bien definida en el sistema de grupos sanguíneos GLOB, sobre todo, el anti-P. No obstante, en la práctica, casi todas las muestras de hematíes están afectadas porque las células que no reaccionan (P^k y *pp*) son extremadamente poco frecuentes[45]. Los hematíes de la sangre del cordón se lisan en la misma proporción que las células de adulto P_1 y P_2.

Tratamiento del suero con 2-mercaptoetanol o ditiotreitol

Las soluciones débiles de 2-mercaptoetanol (2-ME) o de ditiotreitol (DTT) destruyen los puentes sulfhidrilo intercatenarios de las gammaglobulinas. Los anticuerpos IgM tratados de esta forma pierden su capacidad de aglutinar los hematíes, mientras que los anticuerpos IgG no la pierden[9]. Los anticuerpos IgA pueden, o no, ser inhibidos dependiendo de si están, o no, compuestos de polímeros de IgA. Dado que la mayoría de los autoanticuerpos son IgM o IgG, el tratamiento del suero o de un eluido con 2-ME o con DTT da una indicación fiable de la clase de anticuerpo Ig que se está investigando[9,46].

Método

2-Mercaptoetanol

A 1 volumen de suero no diluido se añade 1 volumen de 2-ME, 0,1 mol/l, en tampón fosfato a pH 7,2 (v. pág. 589).

Como control, añadir un volumen de suero al tampón fosfato solo. Incubar ambos a 37 °C durante 2 h. Después, titular el suero tratado y su control con los hematíes adecuados.

Si hay presencia de anticuerpos IgG, la titulación de anticuerpos en el suero de control será la misma que la del suero tratado. Sin embargo, si el anticuerpo es IgM, el suero tratado no podrá aglutinar los hematíes de prueba o los aglutinará a un título muy inferior en comparación con el suero no tratado de control.

El control debe permanecer activo para demostrar que la ausencia de aglutinación es el resultado de la reducción de anticuerpo IgM y no de la dilución.

Ditiotreitol

Se puede utilizar DTT, 0,01 mol/l, en lugar del 2-ME, 0,1 mol/l, en el método anterior.

Anemias hemolíticas de origen inmunitario inducidas por fármacos

Las anemias hemolíticas adquiridas pueden desarrollarse como resultado de reacciones inmunológicas consecutivas a la administración de ciertos fármacos[6,47-49]. Clínicamente, se parecen mucho a las AHA de origen «idiopático» y, por esta razón, hay que preguntar cuidadosamente sobre la toma de fármacos en la anamnesis de cualquier paciente con sospecha de anemia hemolítica adquirida.

Se conocen dos mecanismos inmunológicos que producen una anemia hemolítica inducida por fármacos. Nos referimos a estos mecanismos como «inmunidad dependiente del fármaco» y «autoinmunidad inducida por fármacos». Ambos tipos de anticuerpo pueden estar presentes en algunos pacientes[50,51]. Unificando conceptos, la orientación final de estos anticuerpos cubre un espectro en el cual la respuesta inmunitaria primaria se inicia por una interacción entre el fármaco, o sus metabolitos, y un componente de la membrana de la célula sanguínea para crear un neoantígeno[52]. Los anticuerpos dependientes del fármaco se unen tanto al fármaco como a la membrana celular, pero no a cualquiera de ellos de forma separada. Si se retira el fármaco, la reacción inmunitaria persiste. Se ha postulado que en el caso de los autoanticuerpos, la mayor parte del neoantígeno es lo bastante similar a la membrana celular

normal para permitir la unión sin que el fármaco esté presente. Se han descrito mecanismos similares para la trombocitopenia inmunitaria inducida por fármacos y para la neutropenia de origen inmunológico (v. pág. 435).

En la anemia hemolítica inmunitaria dependiente de fármacos, se necesita la presencia del fármaco en el sistema *in vitro* para detectar los anticuerpos. Los hematíes resultan dañados por uno de los siguientes dos mecanismos:

1. *Lisis del complemento*. La historia típica es la de la hemólisis, que puede ser grave e intravascular, consecutiva a la readministración de un fármaco con el que el paciente había sido previamente tratado, y la de la hemólisis que persiste cuando el fármaco responsable se retira. Es probable que la PAD se haga fuertemente positiva durante la fase hemolítica, con aglutinación de los hematíes del paciente por los anti-C' y a veces por los anti-IgG.

Entre los fármacos que se ha demostrado que causan una hemólisis por el mecanismo explicado anteriormente se encuentran la quinina, la quinidina y la rifampicina, la clorpropamida, la hidroclorotiazida, la nomifensina, la fenacetina, la salicilazosulfapiridina, la sal de sodio del ácido *p*-aminosalicílico y el estibofén. Petz y Branch enumeraron 25 fármacos de los que se había notificado que producían hemólisis por este mecanismo[48].

2. *Hemólisis extravascular*. Está producida por anticuerpos IgG que habitualmente no activan el complemento o, si lo hacen, no más allá de C3. La PAD será positiva con el anti-IgG y a veces también con el anti-C'.

La anemia hemolítica asociada con una terapia prolongada con penicilina a altas dosis está producida por el mecanismo mencionado previamente, y otros derivados de la penicilina, así como las cefalosporinas y la tetraciclina, pueden causar hemólisis de forma similar. La hemólisis cesa cuando el fármaco responsable se identifica y se retira.

Las cefalosporinas, además de causar la formación de anticuerpos específicos, pueden alterar la superficie del eritrocito y causar una adherencia inespecífica del complemento y de las inmunoglobulinas. Esto puede originar una PAD positiva, que raras veces se asocia con un aumento de la hemólisis, pero, cuando se produce, puede ser muy grave.

Anemias hemolíticas autoinmunes inducidas por fármacos

En el caso de las anemias hemolíticas autoinmunes inducidas por fármacos, el anticuerpo reacciona con el eritrocito en ausencia del fármaco (algunas veces se hace referencia a ellos como «anticuerpos independientes del fármaco»). Los autoanticuerpos anti-eritrocito parecen ser serológicamente idénticos a los de la AHA «idiopática» por anticuerpo caliente. En relación con los fármacos de amplia utilización, la gran mayoría de los casos fueron consecutivos al uso del fármaco antihipertensivo α-metildopa. Los hematíes están recubiertos con IgG y el suero contiene autoanticuerpos que, de forma característica, presentan una especificidad Rh.

Otros fármacos, de los que se ha notificado que actúan de forma similar a la α-metildopa, son la L-dopa, el clordiazepóxido, el ácido mefenámico, el ácido flufenámico y la indometacina[2].

En la tabla 11.9 se resumen las características serológicas típicas de los distintos tipos de anemias hemolíticas inducidas por fármacos de origen inmunológico.

Detección de los anticuerpos antipenicilina

Las características típicas de la anemia hemolítica inducida por penicilina son las siguientes:

1. La hemólisis sólo se produce en pacientes que reciben grandes dosis de penicilina durante períodos prolongados (p. ej., semanas).
2. La PAD es fuertemente positiva con los reactivos anti-IgG.
3. El suero del paciente y el anticuerpo eluido de los hematíes del paciente reaccionan únicamente con los hematíes tratados con penicilina; no reaccionan con los hematíes normales sin tratar.

Reactivos

Tampón de barbital. 0,14 mol/l, pH 9,5 (v. pág. 588).

Solución de penicilina. 0,4 g de penicilina G disuelta en 6 ml de tampón de barbital.

Hematíes normales recubiertos de penicilina

Lavar los hematíes reactivos del grupo O tres veces en solución salina y preparar una suspensión en solución salina

Tabla 11.9. Características serológicas de los distintos tipos de anemias hemolíticas inducidas por fármacos de origen inmunológico

Mecanismo	Fármaco prototipo	PAD	PAI		
			Sin fármaco	Suero + fármaco	Eluido + fármaco
Anticuerpo dependiente del fármaco:					
(a) Activación del C'	Quin(id)ina	C'[a]	Neg	C'[a]	Neg
(b) Sin activación del C'	Penicilina	IgG	Neg	IgG	IgG
Anticuerpo	α-Metildopa	IgG	IgG		

[a] Ocasionalmente también IgG.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

al 15% aproximadamente a la que se haya añadido la décima parte de un volumen de tampón de barbital. Añadir 2 ml de la suspensión de hematíes a 6 ml de la solución de penicilina e incubarla a 37 °C durante 1 h. Después, lavar cuatro veces en solución salina y preparar suspensiones de hematíes al 2% en solución salina (para las pruebas en tubo).

Hematíes normales de control

Los hematíes normales de control deben tratarse exactamente de la misma forma que los hematíes recubiertos de penicilina, con la única excepción de que se reemplazan 6 ml de la solución de penicilina por 6 ml del tampón de barbital.

Método

Los anticuerpos antipenicilina pueden detectarse con la PAI de la forma habitual utilizando los hematíes recubiertos de penicilina en lugar de las células normales sin modificar. Sin embargo, son necesarios tres controles adicionales.

1. Se deben añadir al suero del paciente hematíes que no hayan sido expuestos a la penicilina.
2. Los hematíes tratados con penicilina deben añadirse a dos sueros normales que se sepa que no contienen anticuerpos antipenicilina *(controles negativos)*.
3. Los hematíes tratados con penicilina deben añadirse a un suero (si se dispone de él) que se sepa que contiene anticuerpos antipenicilina *(control positivo)*.

Se puede utilizar la cefalosporina de forma similar para sensibilizar a los hematíes. El control (2) es particularmente importante cuando se utilizan fármacos como las cefalosporinas, porque la sobreexposición *in vitro* a estos fármacos puede producir resultados positivos con los sueros normales.

Nota

Algunos fármacos no se disuelven fácilmente; en tales casos puede ser útil incubarlos a 37 °C, trocear las tabletas con la mano de almirez o agitar vigorosamente la solución.

Los anticuerpos antipenicilina IgG a título elevado causan, a menudo, una aglutinación directa de los hematíes tratados con penicilina en diluciones bajas de suero. Los anticuerpos pueden diferenciarse de los anticuerpos IgM aglutinadores mediante el tratamiento con 2-ME o con DTT (v. pág. 220).

Detección de anticuerpos contra otros fármacos distintos de la penicilina

En un paciente con una anemia hemolítica inmunitaria, cuyo suero y eluido eritrocitario no reaccionan con los hematíes normales y que está en tratamiento con uno o varios fármacos distintos de la penicilina o de un derivado de la penicilina, deben buscarse los anticuerpos que reaccionan con los hematíes únicamente en presencia del fármaco o fármacos sospechosos de la siguiente forma.

Se debe probar el suero del paciente y los eluidos eritrocitarios con hematíes del grupo O normales y tratados con enzimas, realizando las pruebas con y sin el fármaco con el que el paciente está en tratamiento. El método es esencialmente empírico. Hay que elaborar una solución saturada del fármaco o de su metabolito en solución salina y ajustar el pH a 6,5-7,0.

Preparar 6 tubos que contengan el suero del paciente y la solución del fármaco en las proporciones mostradas en la tabla 11.10 y añadir 1 gota de una suspensión en solución salina al 50% de células del grupo O a cada tubo. Incubar a 37 °C durante 1 h y examinarlos en busca de aglutinación y de lisis. Lavar los hematíes cuatro veces en solución salina y realizar una PAI utilizando anti-IgG y anti-C' de forma separada.

Interpretación

Los tubos 1 y 2 prueban el suero del paciente (¿anticuerpo dependiente del fármaco?) y los hematíes normales en presencia del fármaco (tubo 1) y sin el fármaco (tubo 2). Los tubos 3 y 4 prueban el efecto del complemento añadido a las reacciones previas. Los tubos 5 y 6 sin el suero del paciente actúan como controles para los tubos 3 y 4.

ANEMIA HEMOLÍTICA INDUCIDA POR OXIDANTES

Se debe sospechar una anemia hemolítica inducida por oxidantes cuando la extensión sanguínea de un paciente expuesto a un fármaco o a un compuesto químico oxidante muestra células irregularmente contraídas. La prueba de los cuerpos de Heinz (v. pág. 270) es confirmadora. El oxidante puede causar también una metahemoglobinemia o una sulfahemoglobinemia; ambas pueden confirmarse por espectroscopia (v. pág. 171) o cooximetría. El diagnóstico diferencial de la hemólisis inducida por un oxidante exógeno incluye otras causas de hemólisis con células irregularmente contraídas (p. ej., síndrome de Zieve), el déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) y la presencia de

Tabla 11.10. Investigación de una anemia hemolítica inmunitaria sospechosa de ser inducida por fármacos

	Tubo n.º					
	1	2	3	4	5	6
Suero del paciente (gotas)	10	10	5	5	0	0
Suero normal fresco (gotas)	0	0	5	5	10	10
Volúmenes de la solución del fármaco (gotas)	2	0	2	0	2	0
Volúmenes de solución salina (gotas)	0	2	0	2	0	2
Volúmenes de 50% de células del grupo O normales (gotas)	1	1	1	1	1	1

una hemoglobina inestable. En el síndrome de Zieve (hemólisis asociada con exceso de alcohol, hígado graso e hiperlipidemia), el plasma puede ser visiblemente lipidémico; si se sospecha este síndrome, las investigaciones posteriores deben incluir pruebas de función hepática y mediciones de lípidos en suero.

ANEMIAS HEMOLÍTICAS MICROANGIOPÁTICAS Y MECÁNICAS

Se debe sospechar una anemia hemolítica microangiopática o mecánica cuando haya fragmentos de hematíes en la extensión. El examen de la extensión sanguínea es, de hecho, el procedimiento de laboratorio más importante para hacer este diagnóstico. Dado que la hemólisis es intravascular, las pruebas con utilidad para la confirmación consisten en la estimación de la haptoglobina sérica (v. pág. 164) y, cuando el trastorno sea crónico, en la tinción de Perl del sedimento urinario para detectar la presencia de hemosiderina (v. pág. 168). Ya que la anemia hemolítica microangiopática es, a menudo, parte de un síndrome más generalizado consecutivo a un daño microvascular, en los casos sin explicación están indicadas otras pruebas. Entre ellas se encuentran las pruebas de función renal, el recuento plaquetario y unas pruebas de coagulación que incluyan las pruebas del dímero D o los productos de degradación de la fibrina (v. pág. 371). Las pruebas para *E. coli* productora de verotoxina están indicadas en los casos de anemia hemolítica microangiopática con insuficiencia renal. La prueba de cuantificación de la proteasa disociadora del factor de Von Willebrand (ADAMTS13), si se dispone de ella, está indicada cuando se sospecha que el paciente presenta púrpura trombocitopénica trombótica.

HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es un trastorno clónico adquirido de la hematopoyesis en el que los hematíes del paciente tienen una sensibilidad anómala a la lisis provocada por los componentes normales del plasma. En su forma clásica, se caracteriza por hemoglobinuria durante el sueño (hemoglobinuria nocturna), ictericia y hemosiderinuria. Sin embargo, no es infrecuente que la HPN se presente como una anemia confusa sin una evidencia obvia de hemólisis intravascular, o que se desarrolle en un paciente que presenta una anemia aplásica o, más raramente, una mielofibrosis o una leucemia mieloide crónica[53,54].

Los hematíes de la HPN son extraordinariamente susceptibles a la lisis provocada por el complemento[55,56]. Esto puede demostrarse *in vitro* mediante diversas pruebas (p. ej., las pruebas del suero acidificado [Ham][57], de la sucrosa[58], de la trombina[59], de la lisis por anticuerpos fríos[60], de la inulina[61] y del veneno de cobra[62]). En las pruebas del suero acidificado, de la inulina y del veneno de cobra, el complemento se activa por la ruta alternativa, mientras que en la prueba de los anticuerpos fríos y probablemente en la prueba de la trombina, el complemento se activa por la secuencia clásica iniciada a través de la interacción antígeno-anticuerpo. En la prueba de la lisis por la sucrosa, se cree que una baja potencia iónica produce la unión de las moléculas de IgG a la membrana celular de forma inespecífica y la posterior activación del complemento por la ruta clásica. Además, parece que se activa la ruta alternativa[63]. En cada prueba, las células de la HPN sufren lisis debido a que su sensibilidad a la misma está enormemente aumentada por el complemento.

En las pruebas de lisis por sucrosa y por anticuerpos fríos con los hematíes procedentes de diversas anemias diseritropoyéticas (p. ej., anemia aplásica, anemia megaloblástica y mielofibrosis) se pueden observar grados menores de lisis[64,65]. Por tanto, los resultados débilmente positivos en estas pruebas tienen que ser interpretados con cuidado. Sin embargo, los hematíes de la HPN sufren casi siempre una lisis considerable en estas pruebas.

Una característica típica de una prueba positiva para la HPN es que no todas las células de los pacientes sufren lisis, incluso aunque las condiciones de la prueba sean óptimas para que la misma se produzca (fig. 11.1). Esto se debe a que únicamente una proporción de la población de hematíes de un paciente con HPN es hipersensible a la lisis mediada por el complemento. Esta población varía de paciente a paciente y existe una relación directa entre la proporción de hematíes que pueden ser lisados (en cualquiera de las pruebas diagnósticas) y la gravedad de la hemólisis *in vivo*.

El fenómeno de que algunos hematíes fueran sensibles a la lisis mediada por complemento mientras que otros no lo fueran fue estudiado cuantitativamente por Rosse y Dacie, quienes obtuvieron curvas de sensibilidad a dos componen-

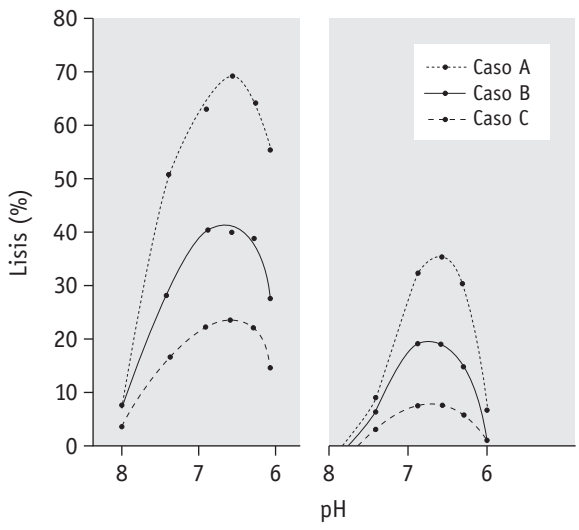


Figura 11.1. Efecto del pH en la lisis *in vitro* de los hematíes de la hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) por el suero humano. Se utilizaron hematíes de tres pacientes de diferente sensibilidad y dos sueros normales frescos; uno de los sueros era más potente que el otro.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

tes del complemento en una serie de pacientes con HPN[56]. Más tarde, Rosse notificó que en algunos casos se habían podido demostrar tres poblaciones de hematíes[66,67].

1. Células muy sensibles (tipo III). De 10 a 15 veces más sensibles que las células normales.
2. Células de sensibilidad media (tipo II). De 3 a 5 veces más sensibles que las células normales.
3. Células de sensibilidad normal (tipo I).

In vivo, la proporción de células de tipo III discurre paralela a la gravedad de la hemólisis del paciente.

La HPN es un trastorno clónico adquirido[68] que resulta de una mutación somática producida en una célula madre hematopoyética. Se ha demostrado que una proporción de granulocitos, plaquetas y linfocitos también forman parte del clon de la HPN[69,70]. La característica típica de las células que pertenecen al clon de la HPN es que son deficitarias en diversas proteínas unidas a la membrana celular, incluyendo la acetilcolinesterasa eritrocitaria[71-73], la fosfatasa alcalina de los neutrófilos[74-76], la CD55 (factor acelerador de la descomposición o DAF, del inglés *decay accelerating factor*)[77,78], el factor de restricción homóloga (HRF, del inglés *homologous restriction factor*)[55,79] y la CD59 (inhibidor de membrana de la lisis reactiva o MIRL, del inglés, *membrane inhibitor of reactive lysis*)[80-82] entre otros. Tanto la CD55, como la CD59 y el HRF desempeñan un papel en la protección de la célula contra el ataque mediado por complemento. La CD59 inhibe la formación del complejo terminal del complemento y se ha determinado que el déficit de CD59 es en gran medida responsable de la sensibilidad al complemento de los hematíes en la HPN. Los hematíes tipo III de la HPN tienen un déficit completo de CD59, mientras que los hematíes tipo II de la HPN sólo presentan un déficit parcial, y es esta diferencia la responsable de sus distintas sensibilidades al complemento[83,84]. El análisis de estas proteínas deficitarias en las células de la HPN por citometría de flujo, sobre todo en los hematíes y en los neutrófilos, se ha convertido en una útil herramienta de investigación y diagnóstico, pero que sólo es aplicable en centros con un número significativo de pacientes que requieran un examen de la HPN. La comparación del porcentaje de células deficitarias en CD59 con el porcentaje de lisis en la prueba de Ham ha posibilitado la evaluación de la sensibilidad de la prueba de Ham. La prueba de Ham estándar es razonablemente buena para estimar la proporción de hematíes en la HPN en tanto en cuanto sean células del tipo III de la HPN y representen menos del 20% del total. En los casos en que las células de la HPN sean del tipo II y haya más del 20%, la prueba de Ham estándar subestima de forma significativa el porcentaje de hematíes de la HPN. La prueba de Ham estándar puede ser negativa cuando las células del tipo III de la HPN sean inferiores al 5% o las células del tipo II de la HPN inferiores al 20%. Cuando la prueba de Ham se suplementa con magnesio, para optimizar la activación del complemento, el porcentaje de lisis da una estimación más exacta de la proporción de células de la HPN (fig. 11.2)[85].

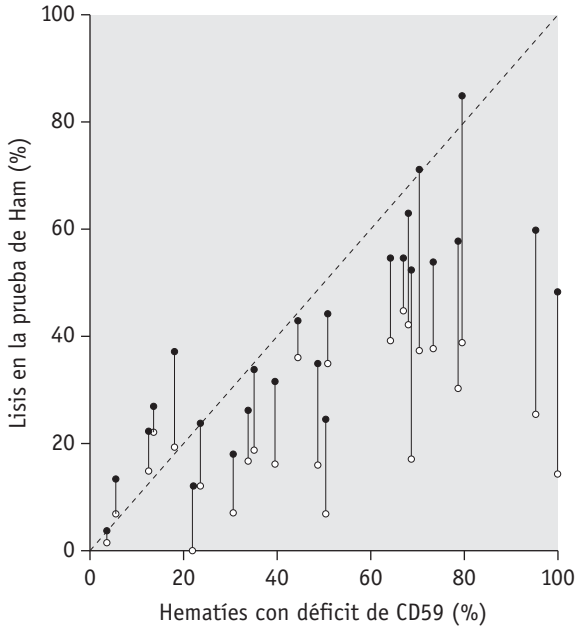


Figura 11.2. Comparación de la proporción de hematíes con déficit de CD59 con la lisis en la prueba de Ham. Se representa el porcentaje de lisis en la prueba de Ham con magnesio añadido (•) y sin magnesio añadido (o) contra la proporción de hematíes con déficit de CD59 en las mismas muestras de 25 pacientes con hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN). (Con nuestro agradecimiento a P. Hillmen, M. Bessler, D. Roper y L. Luzzatto; observación no publicada.)

Ciertos compuestos químicos, en particular los componentes sulfhidrilo, pueden actuar sobre los hematíes normales *in vitro* para aumentar su sensibilidad al complemento. De esta forma, se pueden crear en el laboratorio hematíes tipo HPN y utilizarlos como reactivos útiles.

Prueba de la lisis en suero acidificado (prueba de Ham)

Principio

Los hematíes del paciente se exponen a 37 °C a la acción del suero propio del paciente o del suero normal convenientemente acidificado hasta el pH óptimo para la lisis (pH 6,5-7,0) (tabla 11.11).

Los hematíes del paciente pueden obtenerse a partir de sangre desfibrinada, heparinizada, oxalatada, citratada o con EDTA, y la prueba se puede realizar satisfactoriamente incluso en células almacenadas a 4 °C durante 2-3 semanas en ACD o en solución de Alsever, siempre que se hayan mantenido estériles. La mejor forma de obtener el suero del paciente es por desfibrinación, porque en la HPN, si el suero se ha obtenido de sangre que haya coagulado de forma ordinaria a 37 °C o a temperatura ambiente, presentará, casi con toda seguridad, una lisis notable. El suero normal debe obtenerse igualmente por desfibrinación, aunque también puede utilizarse el suero obtenido por sangre que haya coagulado espontáneamen-

Tabla 11.11. Prueba de la lisis en suero acidificado con adición de magnesio

	Prueba (ml)		Controles (ml)			
Reactivos	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Suero normal fresco	0,5	0,5	0	0,5	0,5	0
Suero normal inactivado por calor	0	0	0,5	0	0	0,5
HCl, 0,2 mol/l	0	0,05	0,05	0	0,05	0,05
50% de hematíes del paciente	0,05	0,05	0,05	0	0	0
50% de hematíes normales	0	0	0	0,05	0,05	0,05
Cloruro de magnesio (250 mmol/l; 23,7 g/l)[a]	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Lisis (en una prueba modificada positiva)	Trazas (2%)	+++ (30%)	–	–	–	–

[a] Únicamente para la prueba modificada.

te a temperatura ambiente o a 37 °C. Es preferible utilizar un suero normal, que se sabe que causará una intensa lisis a los hematíes de la HPN, que el suero del paciente, cuyo potencial de lisis se desconoce. Sin embargo, si la prueba es positiva utilizando suero normal, es importante, sobre todo si el paciente no parece presentar una hemólisis intravascular manifiesta, obtener un resultado positivo utilizando el suero del paciente para excluir la multinuclearidad eritroide hereditaria asociada con una prueba de suero acidificado positiva (HEMPAS) (v. página 226). La variabilidad entre los sueros de distintos individuos en su capacidad para lisar los hematíes de la HPN se muestra en la figura 11.1. La actividad de un único suero individual varía también según los momentos[86] y, por tanto, siempre es importante incluir en cualquier prueba, como un control positivo, una muestra de células conocidas de HPN o de células «tipo HPN» creadas artificialmente (v. pág. 228).

Hay que utilizar los sueros a las pocas horas de su extracción. Su potencial lítico se mantiene durante varios meses a –70 °C, pero a 4 °C e incluso a –20 °C, se deteriora en unos pocos días.

Método

Depositar muestras de 0,5 ml de suero fresco normal, del grupo AB o ABO compatible con la sangre del paciente, en 6 tubos (3 pares) de 75 × 12 mm. Colocar dos tubos a 56 °C durante 10-30 min para inactivar el complemento. Mantener las otras 2 parejas de tubos a temperatura ambiente y añadir al suero en 2 de los tubos la décima parte de un volumen (0,05 ml) de HCl, 0,2 mol/l. Añadir volúmenes similares de ácido a las muestras de suero inactivado. Después, colocar todos los tubos en un baño María a 37 °C.

Mientras se tratan las muestras de suero, lavar las muestras de los hematíes del paciente y de los hematíes normales de control (compatibles con el suero normal) dos veces en solución salina y preparar suspensiones en solución salina al 50%. Después, añadir la décima parte de un volumen de cada una de estas suspensiones celulares (0,05 ml) a uno de los tubos que contienen suero fresco sin acidificar, suero fresco acidificado y suero acidificado inactivo respectivamente. Mezclar cuidadosamente los contenidos y dejar los tubos a 37 °C. Después centrifugarlos durante cerca de 1 h.

Añadir 0,05 ml de cada suspensión celular a 0,55 ml de agua para preparar un estándar para la medición cuantitativa posterior de la lisis y retener 0,5 ml de suero para utilizarlo como blanco. Para la medición de la lisis, depositar volúmenes de 0,3 ml de los sobrenadantes de las suspensiones de suero-células de la serie de pruebas y de control, de la suspensión de suero blanco y de la suspensión de células lisadas equivalentes al 0 y al 100% de la lisis respectivamente, en 5 ml de amoníaco, 0,4 ml/l o de reactivo de Drabkin. Medir la lisis en un colorímetro fotoeléctrico utilizando un filtro amarillo-verde (p. ej., Ilford 625) o en un espectrómetro a una longitud de onda de 540 nm.

Si las células de las pruebas son de un paciente con HPN, experimentarán una lisis bien definida, aunque incompleta, en el suero acidificado. Una lisis mucho menor o incluso inexistente se podrá observar en el suero no acidificado. No se obtendrá ninguna lisis con el suero acidificado inactivo. La muestra de células normales de control no presentará lisis en ninguno de los tres tubos.

En la HPN, se obtiene habitualmente una lisis del 10-50% cuando ésta se mide como hemoglobina liberada. De forma excepcional, la lisis puede ser de hasta un 80% o llegar tan sólo al 5%.

Los hematíes de un paciente que haya recibido una transfusión presentarán menos lisis de la que hubieran presentado antes de la transfusión, porque las células normales transfundidas no tienen una sensibilidad aumentada a la lisis. En la HPN, es típico que una población de células jóvenes (ricas en reticulocitos), como la capa superior de hematíes obtenida por centrifugación, presente más lisis que los hematíes obtenidos de una mezcla de sangre total.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Prueba de la lisis en suero acidificado con adición de magnesio (prueba de Ham modificada)

Principio

La sensibilidad de la prueba de Ham puede mejorarse añadiendo magnesio a la prueba para potenciar la activación del complemento.

Método

El método es idéntico al de la prueba de Ham estándar (v. antes) con la adición de 10 ml de cloruro magnésico, 250 mmol (concentración final igual a 4 mmol), a cada tubo antes de la incubación (v. tabla 11.11).

Significado de la prueba de la lisis en suero acidificado

Una prueba en suero acidificado positiva, realizada con los controles adecuados, indica la anomalía de la HPN y ésta no puede ser diagnosticada a menos que la prueba de suero acidificado sea positiva. La adición de cloruro magnésico aumenta la sensibilidad de la prueba en suero acidificado.

Cuando la prueba en suero acidificado sea positiva, se debe realizar también una prueba de la antiglobulina directa (v. pág. 429). Si ésta es positiva, puede ser el resultado de un anticuerpo lítico que haya dado una falsa positividad en la prueba en suero acidificado. Esto puede confirmarse mediante los estudios serológicos adecuados. En estos casos complejos se recomienda una citometría de flujo tras la reacción de los hematíes con el anti-CD59 porque es una prueba más definitiva para la HPN (v. más adelante).

El único trastorno distinto de la HPN que puede dar aparentemente un resultado positivo definido de la prueba es una anemia diseritropoyética congénita poco frecuente: la anemia diseritropoyética congénita tipo II o HEMPAS[87,88]. Sin embargo, en contraste con la HPN, los hematíes de la HEMPAS sólo presentan lisis en un porcentaje (alrededor del 30%) de los sueros normales; además, no experimentan lisis en el propio suero acidificado del paciente y la prueba de la lisis en sucrosa es negativa. En la HEMPAS, la expresión de las proteínas unidas al glucosilfosfatidilinositol (GPI), tales como la CD55 y la CD59, es normal. La lisis en la HEMPAS parece ser el resultado de la presencia en los hematíes de un antígeno inusual, que reacciona con un anticuerpo IgM fijador del complemento («anti-HEMPAS») presente en muchos, aunque no en todos, los sueros normales[88].

El calentamiento a 56 °C inactiva el sistema lítico y, si hay lisis en el suero inactivado, la prueba no puede considerarse positiva. Los hematíes notablemente esferocíticos o los hematíes normales débiles pueden lisarse en el suero acidificado, debido probablemente al pH reducido, y tales células pueden también lisarse en el suero acidificado inactivo.

Los hematíes de la HPN no son excesivamente sensibles a la lisis por un pH reducido *per se*. La adición del ácido ajusta el pH de la mezcla suero-células al punto óptimo para la actividad del sistema lítico. Como se muestra en la figura 11.1, si se utilizan diferentes concentraciones de ácido es posible construir curvas de pH-lisis. El pH óptimo para la lisis está entre 6,5 y 7,0 (mediciones realizadas tras la adición de los hematíes al suero).

Prueba de la lisis en sucrosa

Se necesita una solución isoosmótica de sucrosa (92,4 g/l)[89]. Puede almacenarse a 4 °C hasta 3 semanas.

Para la prueba, preparar dos tubos: uno que contenga 0,05 ml de suero fresco normal compatible con los grupos AB o ABO diluido en 0,85 ml de una solución de sucrosa y el otro que contenga 0,05 ml de suero diluido en 0,85 ml de solución salina. Añadir a cada tubo 0,1 ml de una suspensión al 50% de hematíes lavados. Tras la incubación a 37 °C durante 30 min, centrifugar los tubos y examinarlos en busca de lisis. Si se observa lisis en el tubo que contiene sucrosa, medirla con un colorímetro fotoeléctrico o con un espectrómetro como se ha descrito anteriormente, utilizando el tubo que contiene suero diluido en solución salina como blanco y un tubo que contenga 0,1 ml de la suspensión de hematíes en 0,9 ml de amoníaco, 0,4 ml/l, en lugar de la mezcla sucrosa-suero como estándar para una lisis del 100%.

Interpretación

La prueba de la lisis en sucrosa se basa en el hecho de que los hematíes absorben del suero los componentes del complemento a bajas concentraciones iónicas[86,90]. Las células de la HPN, debido a su gran sensibilidad, experimentan una lisis pero los hematíes normales no. Los hematíes de algunos pacientes con leucemia[64] o con mielofibrosis pueden presentar una pequeña cantidad de lisis, casi siempre inferior al 10%; en estos casos, la prueba del suero acidificado es habitualmente negativa y no se podría diagnosticar una HPN. En la HPN, la lisis varía habitualmente del 10 al 80%, pero excepcionalmente puede ser de tan sólo un 5%. La lisis en sucrosa y la lisis en suero acidificado de los hematíes de la HPN están muy estrechamente correlacionadas. La prueba de la lisis en sucrosa es, por lo general, negativa en la HEMPAS.

Análisis por citometría de flujo de las proteínas unidas al GPI en los hematíes

Principio

Los hematíes del paciente se tiñen con un anticuerpo marcado con fluoresceína que es específico para alguna de las diversas proteínas unidas al GPI (p. ej., la CD55 [factor acelerador de la descomposición], la CD58 [antígeno-3 de la función leucocitaria] o la CD59 [«protectina»]), que son deficitarias en los hematíes de la HPN. Las células teñidas se analizan a continuación con un citómetro de flujo. En algunos laboratorios que disponen de las instalaciones adecuadas, la citometría de flujo ha sustituido a la prueba de Ham como método principal para el diagnóstico de la HPN.

Los hematíes del paciente pueden obtenerse con cualquiera de los anticoagulantes descritos para la prueba de

Ham. Las células, si se conservan en ACD, pueden almacenarse durante 2-3 semanas antes del análisis. El anti-CD59[b] conjugado con fluoresceína da excelentes resultados cuando se utiliza para el análisis de los hematíes. Es importante utilizar el anticuerpo conjugado porque la tinción con anti-CD59 no conjugado seguida por un anticuerpo conjugado con fluoresceína en la segunda capa puede producir un artefacto, probablemente debido a la aglutinación de los hematíes. No hay un anticuerpo anti-CD55 adecuado que esté disponible comercialmente en la actualidad. El anti-CD58[c] da resultados reproducibles para el análisis de los hematíes, pero el nivel de expresión del CD58 en las células tipo II de la HPN es más elevado que el de muchas otras proteínas unidas al GPI y, por tanto, el estudio de la expresión del CD58 es útil, pero no ideal[91].

Método

Enfriar 1 × 10^6 células en 50 ml de PBS en hielo con 50 ml de anticuerpo monoclonal durante 30 min. Lavar dos veces en PBS + azida (200 mg/l) y enfriar después con anticuerpo de cabra antirratón etiquetado con fluoresceína en hielo y en la oscuridad durante 30 min. Lavar dos veces en PBS + azida y después fijar con aproximadamente 0,5 ml de formaldehído al 1% en Isoton II (Beckman–Coulter). El análisis se realiza con un citómetro de flujo. Se debe utilizar siempre un anticuerpo de control negativo para valorar la fluorescencia de las células a las que les falta el antígeno. Hay que teñir las células de un sujeto normal como control adicional para verificar que las células negativas en la muestra de prueba son células HPN reales y no un artefacto.

Otras técnicas inmunológicas

Las proteínas unidas al GPI tales como la CD59 se pueden también estudiar mediante una modificación de la tecnología de gel utilizada para la tipificación sanguínea.

Análisis por citometría de flujo de las proteínas unidas al GPI en los neutrófilos

Principio

Se ha demostrado que un porcentaje de los neutrófilos de los pacientes forma parte del clon de HPN en todos los pacientes con HPN. Las proteínas unidas al GPI adecuadas para el análisis son CD16, CD24, CD55, CD59 y CD67[92,93]. Se dispone de numerosos anticuerpos a CD16 conjugados con fluoresceína que son adecuados para su utilización en este análisis: por ejemplo, anti-Leu-11a conjugado con fluoresceína (Beckman–Coulter) o anti-CD59 conjugado con fluoresceína (Cymbus Biosciences).

Método

Los neutrófilos del paciente se obtienen extrayendo sangre, anticoagulándola con heparina sin conservantes (10 UI/ml) y obteniendo una capa de leucocitos. La formación de la capa de leucocitos puede acelerarse añadiendo 1 ml de hetastarch (hidroxietilalmidón) al 6% en cloruro sódico al 0,9% (Hespan, DuPont) a 10 ml de sangre. Después se analizan 1-2 × 10^6 células. Es importante que todas las tinciones y lavados posteriores se realicen a 4 °C para minimizar la tinción inespecífica. Enfriar las células en 50 ml de PBS en hielo con 50 ml de anticuerpo monoclonal (AcMo) durante 30 min. Lavar dos veces en PBS + ASB al 0,1% (PBS + ASB) y enfriar después con anticuerpo de cabra antirratón etiquetado con fluoresceína en hielo y en la oscuridad durante 30 min. Lavar dos veces en PBS + ASB y después fijar con aproximadamente 0,5 ml de formaldehído al 1% en Isoton II (Beckman-Coulter). Para los anticuerpos conjugados, se requiere un único paso de incubación seguido por un lavado y después la fijación previa al análisis. El análisis se realiza utilizando un citómetro de flujo. Hay que probar siempre los controles normales y negativos adecuados en paralelo con las muestras del paciente.

Se debe utilizar siempre un anticuerpo de control negativo para valorar la fluorescencia de las células a las que les falta el antígeno. Hay que teñir las células de un sujeto normal como control adicional para verificar que las células negativas en la muestra de prueba son células HPN reales y no un artefacto.

Significado del análisis de flujo citométrico

La presencia de una población de células con un déficit de más de una proteína ligada al GPI es diagnóstica de HPN (fig. 11.3). Es importante analizar más de una proteína por-

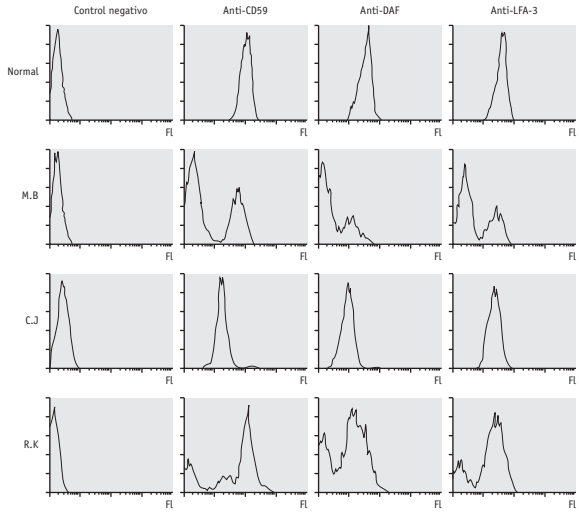


Figura 11.3. Expresión de las proteínas unidas al glucosilfosfatidilinositol (GPI) en los hematíes en la hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN). Citometría de flujo de los hematíes de un control normal y de tres pacientes con HPN teñidos con un anticuerpo de control negativo y con anticuerpos a diversas proteínas unidas al GPI. M.B: dos poblaciones; proteínas unidas al GPI normales y ausentes. C.J: proteínas unidas al GPI principalmente reducidas, pero está también presente un componente normal muy pequeño. R.K: tres poblaciones; proteínas unidas al GPI normales, reducidas y ausentes. Fl: intensidad de la fluorescencia.

[b] MEM43, Cymbus Bioscience Ltd, Southampton, Reino Unido.
[c] BRIC5, Bioproducts Laboratories, Reino Unido, utilizado a 20 μg/ml.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

que hay casos, extremadamente raros, en los que se ha descrito un déficit hereditario de una proteína (es decir, el fenotipo Inab[94-96], un déficit de CD55 perteneciente a un defecto del gen estructural que codifica esta proteína y un déficit hereditario de CD59[97] debido a un defecto en el gen que codifica a la CD59). El análisis de la expresión de la CD59 en los hematíes posibilita la identificación de los hematíes tipo II de la HPN así como los del tipo III. Esto es importante porque, aunque los pacientes con hematíes tipo II de la HPN no presentan habitualmente una hemólisis significativa, pueden verse afectados por alguna de las complicaciones de la HPN, como la trombosis. El análisis de los neutrófilos para las proteínas ligadas al GPI es más difícil que el análisis de los hematíes. No obstante, es probable que sea más sensible porque la proporción de neutrófilos anómalos es, por lo general, mayor que la proporción de hematíes en la HPN debido a la supervivencia reducida de los hematíes en comparación con las células normales y debido al efecto de las transfusiones. Por tanto, la citometría de flujo aplicada a los neutrófilos es un método más sensible para el diagnóstico de la HPN que los métodos basados en la sensibilidad del complemento a los hematíes de la HPN.

Hematíes tipo HPN

Cuando se tratan hematíes normales con ciertos productos químicos, es posible que aumenten su sensibilidad al complemento, de forma que pueden presentar muchas de las características de los hematíes de la HPN[98]. Dichos productos químicos incluyen los compuestos sulfhidrilo como la L-cisteína, el glutatión reducido, el bromuro de 2-aminoetil-iso-tiouronio (AET) y el ácido 2-mercaptobenzoico[99]. Las células tratadas con AET y con ácido 2-mercaptobenzoico pueden utilizarse convenientemente como control positivo para las pruebas de lisis *in vitro* para la HPN[100].

Preparación de las células con AET

Preparar una solución de 8 g/l de AET y ajustar su pH a 8,0 con NaOH, 5 mol/l. Recoger sangre normal en ACD y lavarla dos veces en NaCl, 9 g/l. Añadir 1 volumen del concentrado de hematíes a 4 volúmenes de la solución con AET en un tubo de 75 × 12 mm, que se tapona a continuación. Mezclar el contenido suavemente y colocar el tubo a 37 °C durante 10-20 min; el tiempo óptimo de incubación varía entre las muestras de hematíes. A continuación, lavar las células repetidamente con grandes cantidades de solución salina hasta que el sobrenadante se vuelva incoloro. Los hematíes están ahora listos para ser utilizados[101].

Resumen de las pruebas para la HPN

La prueba de Ham sigue siendo la prueba diagnóstica principal para la HPN. Si se realiza con cloruro de magnesio adicional y se llevan a cabo los controles necesarios, es más sensible que la prueba sin modificar y mantiene su especificidad para el diagnóstico de la HPN. Es opcional incluir una prueba posterior, como es la prueba de la lisis en sucrosa. La utilización de la citometría de flujo aporta una mejor estimación del tamaño del clon de la HPN e identifica el tipo de anomalía eritrocitaria. Sin embargo, se necesita más experiencia y un equipamiento más caro para realizar una citometría de flujo fiable que para realizar una prueba de Ham. La citometría de flujo es una prueba diagnóstica útil en ciertas circunstancias, especialmente cuando el paciente ha recibido mucha transfusión y es necesario analizar los neutrófilos y en el seguimiento de un paciente tras un trasplante de médula ósea. La citometría de flujo puede tener también su utilidad en el seguimiento de grupos de pacientes con anemia aplásica porque la evolución clónica hacia una HPN puede detectarse en una fase más temprana. Para los laboratorios que ya utilizan la tecnología en gel para la tipificación sanguínea y la detección de anticuerpos, esta técnica proporciona un método sencillo para detectar hematíes con déficit de proteína ligada al GPI.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arndt PA, Leger RM, Garratty G 1999 Serology of antibodies to second and third generation cephalosporins associated with immune hemolytic anaemia and/or positive direct antiglobulin tests. Transfusion 39:1239–1246.
2. Dacie JV, Worlledge SM 1969 Auto-immune hemolytic anaemias. Progress in Hematology 6:82–120.
3. Dacie JV 1975 Auto-immune hemolytic anemias. Archives of Internal Medicine 135:1293–1300.
4. Dacie J 1992 The haemolytic anaemias vol 3. The auto-immune haemolytic anaemias, 3rd ed. (a) p 136, (b) p 276. Churchill Livingstone, Edinburgh.
5. Pirofsky B 1969 Autoimmunization and the autoimmune hemolytic anemias. Williams & Wilkins, Baltimore.
6. Petz LD, Garratty G 1980 Acquired immune hemolytic anemias. Churchill Livingstone, New York.
7. Sokol RJ, Hewitt S 1985 Autoimmune hemolysis: a critical review. CRC Critical Reviews in Oncology/Hematology 4:125–154.
8. Sokol RJ, Hewitt S, Booker DJ, et al 1985 Enzyme linked direct antiglobulin tests in patients with autoimmune haemolysis. Journal of Clinical Pathology 38:912–914.
9. Issitt PD 1985 Serological diagnosis and characterization of the causative autoantibodies. Methods in Hematology 12:1–45.
10. Engelfriet CP, von dem Borne AEG, Beckers D, et al 1974 Auto-immune haemolytic anaemia: serological and immunochemical characteristics of the auto-antibodies: mechanisms of cell destruction. Series Haematologica VII:328–347.
11. Worlledge SM 1978 The interpretation of a positive direct antiglobulin test (Review). British Journal of Haematology 39:157–162.
12. Sokol RJ, Hewitt S, Stamps BK 1981 Autoimmune haemolysis: An 18-year study of 865 cases referred to a regional transfusion centre. British Medical Journal 282:2023–2027.
13. Robertson VM, Dickson LG, Romond EH, et al 1987 Positive antiglobulin tests due to intravenous immunoglobulin in patients who received bone marrow transplant. Transfusion 27:28–31.
14. Ramsey G 1991 Red cell antibodies arising from solid organ transplants. Transfusion;31:76–86.

15. Petz LD 1987 Immunohematologic problems associated with bone marrow transplantation. Transfusion Medicine Reviews 1:85–100.
16. Shulman JA, Petz LD 1996 Red cell compatibility testing: clinical significance and laboratory methods. In: Petz LD, Swisher SN, Kleinman S, et al eds. Clinical practice of transfusion medicine, 3rd ed. p.199–244. New York: Churchill Livingstone.
17. Szymanski IO, Odgren PR, Fortier NL, et al 1980 Red blood cell associated IgG in normal and pathologic states. Blood 55:48–54.
18. Clark JA, Tranley PC, Wallas CH 1992 Evaluation of patients with positive direct antiglobulin tests and non-reactive eluates discovered during pretransfusion testing. Immunohaematology 8:9–12.
19. Heddle NM, Kelton JG, Turchyn KL, et al 1988 Hypergammaglobulinemia can be associated with a positive direct antiglobulin test, a nonreactive eluate, and no evidence of hemolysis. Transfusion 28:29–33.
20. Huh YO, Liu FJ, Rogge K, et al 1988 Positive direct antiglobulin test and high serum immunoglobulin G levels. American Journal of Clinical Pathology 90:197–200.
21. Vianna JL, Ordi-Ros J, Lopez-Soto A, et al 1994 Comparison of the primary and secondary antiphospholipid syndrome: A European Multicenter Study of 114 patients. American Journal of Medicine 96:1–9.
22. Win N, Islam SIAM, Peterkin MA, et al 1997 Positive direct antiglobulin test due to antiphospholipid antibodies in normal healthy blood donors. Vox Sanguinis 72:182–184.
23. Petz LD, Yam P, Wilkinson L, et al 1984 Increased IgG molecules bound to the surface of red blood cells of patients with sickle cell anemia. Blood 64:301–4.
24. Toy PT, Chin CA, Reid ME, et al 1985 Factors associated with positive direct antiglobulin tests in pretransfusion patients: a case control study. Vox Sanguinis 49:215–220.
25. Stratton F, Renton PH 1955 Effect of crystalloid solutions prepared in glass bottles on human red cells. Nature (London) 175:727.
26. Gorst DW, Rawlinson VI, Merry AH, et al 1980 Positive direct antiglobulin test in normal individuals. Vox Sanguinis 38:99–105.
27. Bareford D, Longster G, Gilks L, et al 1985 Follow-up of normal individuals with a positive antiglobulin test. Scandinavian Journal of Haematology 35:348–353.
28. Freedman J 1979 False-positive antiglobulin tests in healthy subjects. Journal of Clinical Pathology 32:1014–1018.
29. Lau P, Haesler WE, Wurzel HA 1976 Positive direct antiglobulin reaction in a patient population. American Journal of Clinical Pathology 65:368–375.
30. Sokol RJ, Booker DJ, Stamps R, et al 1997 IgA red cell autoantibodies and auto-immune hemolysis. Transfusion 37:175–181.
31. Chaplin H Jr 1973 Clinical usefulness of specific antiglobulin reagents in autoimmune hemolytic anemia. Progress in Hematology 8:25–49.
32. Worlledge SM, Blajchman MA 1972 The autoimmune haemolytic anaemias. British Journal of Haematology 23 (Suppl): 61–69.
33. Lai M, Rumi C, D'onofrio G, et al 2002 Clinically significant auto-immune hemolytic anemia with a negative direct antiglobulin test by routine tube test and positive by column agglutination method. Immunohematology 18:112–116.
34. Sokol RJ, Hewitt S, Booker DJ, et al 1987 Small quantities of erythrocyte bound immunoglobulins and auto-immune haemolysis. Journal of Clinical Pathology 40:254–257.
35. Garratty G, Arndt PA 1999 Application of flow cytofluorometry to red blood cell immunology. Cytometry 38: 259–267.
36. Owen I, Hows J 1990 Evaluation of the manual Polybrene technique in the investigation of autoimmune hemolytic anemia. Transfusion 30:814–818.
37. Lalezari P, Jiang AC 1980 The manual Polybrene test: a simple and rapid procedure for detection of red cell antibodies. Transfusion 20:206–211.
38. Branch DR, Petz LD 1999 Detecting alloantibodies in patients with autoantibodies. Transfusion 39:6–10.
39. Landsteiner K, Miller CP Jr 1925 Serological studies on the blood of primates. II. The blood groups in anthropoid apes. Journal of Experimental Medicine 42:853–862.
40. Eicher CA, Wallace ME, Frank S, et al 1978. The Lui elution: a simple method of antibody elution. Transfusion 18: 647–652.
41. Roelcke D 1989 Cold agglutination. Transfusion Medicine Review 3:140–166.
42. Wiener AS, Unger LJ, Cohen L, et al 1956 Type-specific cold auto-antibodies as a cause of acquired hemolytic anemia and hemolytic transfusion reactions: biologic test with bovine red cells. Annals of Internal Medicine 44:221–240.
43. Wolach B, Heddle N, Barr RD, et al 1981 Transient Donath-Landsteiner haemolytic anaemia. British Journal of Haematology 48:425–434.
44. Petz LD, Garratty G 2004 Acquired Immune Haemolytic Anaemias, 2nd ed. p. 224, Churchill Livingstone, New York.
45. Worlledge SM, Rousso C 1965 Studies on the serology of paroxysmal cold hemoglobinuria (PCH) with special reference to a relationship with the P blood group system. Vox Sanguinis 10:293–298.
46. Freedman J, Masters CA, Newlands M, et al 1976. Optimal conditions for the use of suphydryl compounds in dissociating red cell antibodies. Vox Sanguinis 30, 231–239.
47. Habibi B 1987 Drug-induced immune haemolytic anaemias. Baillières Clinical Immunology and Allergy 1:343–356.
48. Petz LD, Branch DR 1985 Drug-induced immune haemolytic anemias. Methods in Haematology 12:47–94.
49. Habibi B 1985 Drug induced red blood cell autoantibodies co-developed with drug specific antibodies causing haemolytic anaemias. British Journal of Haematology 61:139–143.
50. Salama A, Gottsche B, Mueller-Eckhardt C 1991 Autoantibodies and drug- or metabolite-dependent antibodies in patients with diclofenac-induced immune haemolysis. British Journal of Haematology 77:546–549.
51. Salama C, Mueller-Eckhardt C 1987 Cianidanol and its metabolites bind tightly to red cells and are responsible for the production of auto- and/or drug-dependent antibodies against these cells. British Journal of Haematology 66:263266.
52. Salama A, Mueller-Eckhardt C 1992 Immune-mediated blood dyscrasias related to drugs. Seminars in Hematology 29:54–63.
53. Dacie JV, Lewis SM 1972 Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: clinical manifestations, haematology and nature of the disease. Series Haematologica 5:3–23
54. Sirchia G, Lewis SM 1975 Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. Clinics in Haematology 4:199–229.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

55. Hansch GM, Schonermark S, Roeicke D 1987 Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria type III: lack of an erythrocyte membrane protein restricting the lysis by C5b–9. Journal of Clinical Investigation 80:7–12.
56. Rosse WF, Dacie JV 1966 Immune lysis of normal human and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) red blood cells. 1. The sensitivity of PNH red cells to lysis by complement and specific antibody. Journal of Clinical Investigation 45:736–748.
57. Ham TH, Dingle JH 1939 Studies on destruction of red blood cells. II. Chronic hemolytic anemia with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: certain immunological aspects of the hemolytic mechanism with special reference to serum complement. Journal of Clinical Investigation 18: 657–672
58. Hartmann RC, Jenkins DE Jr, Arnold AB 1970 Diagnostic specificity of sucrose hemolysis test for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Blood 35:462–475.
59. Crosby WH 1950 Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. A specific test for the disease based on the ability of thrombin to activate the hemolytic factor. Blood 5:843–846.
60. Dacie JV, Lewis SM, Tills D 1960 Comparative sensitivity of the erythrocytes in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria to haemolysis by acidified normal serum and by a high-titre cold antibody. British Journal of Haematology 6:362–371.
61. Brubaker LH, Schaberg DR, Jefferson DH, et al 1973 A potential rapid screening test for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. New England Journal of Medicine 288: 1059–1060.
62. Kabakci T, Rosse WF, Logue GL 1972 The lysis of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria red cells by serum and cobra factor. British Journal of Haematology 23:693–705.
63. Logue GL, Rossi WF, Adams JP 1973 Mechanisms of immune lysis of red blood cells in vitro. I. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells. Journal of Clinical Investigation 52:1129–1137.
64. Catovsky D, Lewis SM, Sherman D 1971 Erythrocyte sensitivity to in-vitro lysis in leukaemia. British Journal of Haematology 21:541–550.
65. Lewis SM, Dacie JV, Tills D 1961 Comparison of the sensitivity to agglutination and haemolysis by a high-titre cold antibody of the erythrocytes of normal subjects and of patients with a variety of blood diseases including paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. British Journal of Haematology 7:64–72.
66. Rosse WF 1973 Variations in the red cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. British Journal of Haematology 24:327–342.
67. Rosse WF, Adams JP, Thorpe AM 1974 The population of cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria of intermediate sensitivity to complement lysis: significance and mechanism of increased immune lysis. British Journal of Haematology 28:281–290.
68. Oni SB, Osunkoya BO, Luzzatto L 1970 Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: evidence for monoclonal origin of abnormal red cells. Blood 36:145–152.
69. Kinoshita T, Medof ME, Silber R, et al 1985 Distribution of decay-accelerating factor in the peripheral blood of normal individuals and patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Journal of Experimental Medicine 162:75–92.
70. Nicholson-Weller A, Spicier DB, Austen KF 1985 Deficiency of the complement regulating protein "decay accelerating factor" on membranes of granulocytes, monocytes, and platelets in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. New England Journal of Medicine 312:1091–1097.
71. Auditore JV, Hartmann RC 1959 Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: II. Erythrocyte acetylcholinesterase defect. American Journal of Medicine 27:401–410.
72. Chow F-L, Telen MJ, Rosse WF 1985 The acetylcholinesterase defect in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: evidence that the enzyme is absent from the cell membrane. Blood 66:940–945.
73. De Sandre G, Ghiotto G 1960 An enzymic disorder in the erythrocytes of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: a deficiency in acetylcholinesterase activity. British Journal of Haematology 6:39–42.
74. Beck WS, Valentine WN 1965 Biochemical studies on leucocytes. II. Phosphatase activity in chronic lymphatic leucemia, acute leucemia and miscellaneous hematologic conditions. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 38:245–253.
75. Hartmann RC, Auditore JV 1959 Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria I. Clinical studies. American Journal of Medicine 27:389–400.
76. Lewis SM, Dacie JV 1965 Neutrophil (leucocyte) alkaline phosphatase in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. British Journal of Haematology 11:549–556.
77. Nicholson-Weller A, March JP, Rosenfield SI, et al 1983 Affected erythrocytes of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria are deficient in the complement regulatory protein, decay accelerating factor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 80:5066–5070.
78. Pangburn MK, Schreiber RD, Müller-Eberhard HF 1983 Deficiency of an erythrocyte membrane protein with complement regulatory activity in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 80:5430–5434.
79. Zalman LS, Wood LM, Frank MM, et al 1987 Deficiency of the homologous restriction factor in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Journal of Experimental Medicine 165: 572–577.
80. Davies A, Simmons DL, Hale G, et al 1989 CD59 and LY–6-like protein expressed in human lymphoid cells, regulates the action of the complement membrane attack complex on homologous cells. Journal of Experimental Medicine 170:637–654.
81. Holguin MH, Wilcox LA, Bernshaw NJ, et al 1989 Relationship between the membrane inhibitor of reactive lysis and the erythrocyte phenotypes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Journal of Clinical Investigation 84: 1387–1394.
82. Holguin MH, Fredrick NJ, Bernshaw LA, et al 1989 Isolation and characterization of a membrane protein from normal human erythrocytes that inhibits reactive lysis of the erythrocytes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Journal of Clinical Investigation 84:7–17.
83. Rosse WF, Hoffman S, Campbell M, et al 1991 The erythrocytes in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria of intermediate sensitivity to complement lysis. British Journal of Haematology 79:99–107.
84. Shichishima T, Terasawa T, Hashimoto C, et al. 1991 Heterogenous expression of decay accelerating factor and CD59/membrane attack complex inhibition factor on paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) erythrocytes. British Journal of Haematology 78:545–550.

85. May JE, Rosse WF, Frank MM 1973 Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: alternative-complement-pathway-mediated lysis induced by magnesium. New England Journal of Medicine 289:705–709.
86. Packman CH, Rosenfeld SI, Jenkins DE Jr, et al 1979 Complement lysis of human erythrocytes. Differing susceptibility of two types of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells to C5b-9. Journal of Clinical Investigation 64:428–433.
87. Crookston JH, Crookston MC, Burnie KL, et al 1969 Hereditary erythroblastic multinuclearity associated with a positive acidified-serum test: a type of congenital dyserythropoietic anaemia. British Journal of Haematology 17:11–26.
88. Verwilghen RL, Lewis SM, Dacie JV 1973 HEMPAS: congenital dyserythropoietic anaemia (type II). Quarterly Journal of Medicine 42:257–278.
89. Hartmann RC, Jenkins DE Jr 1966 The "sugar water" test for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. New England Journal of Medicine 275:155–157.
90. Mollison PL, Polley MJ 1964 Uptake of g-globulin and complement by red cells exposed to serum at low ionic strength. Nature (London) 203:535.
91. Hillmen P, Hows JM, Luzzatto L 1992 Two distinct patterns of glycosylphosphatidylinositol (GPI) linked protein deficiency in the red cells of patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. British Journal of Haematology 80:399–405.
92. Plesner T, Hansen NE, Carlsen K 1990 Estimation of PI-bound proteins on blood cells from PNH patients by quantitative flow cytometry. British Journal of Haematology 75:585–590.
93. van der Schoot CE, Huizinga TWJ, van't Veer-Korthof ET, et al 1990 Deficiency of glycosyl-phosphatidylinositol-linked membrane glycoproteins of leukocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, description of a new diagnostic cytofluorometric assay. Blood 76: 1853–1859.
94. Merry AH, Rawlinson VI, Uchikawa M, et al 1989 Studies on the sensitivity to complement-mediated lysis of erythrocytes (Inab phenotype) with a deficiency of DAF (decay accelerating factor). British Journal of Haematology 73:248–253.
95. Merry AH, Rawlinson VI, Uchikawa M, et al 1989 Lack of abnormal sensitivity to complement-mediated lysis in erythrocytes deficient only in decay accelerating factor. Biochemical Society Transactions 17:514.
96. Telen MJ, Green AM 1989 The Inab phenotype: characterization of the membrane protein and complement regulatory defect. Blood 74:437–441.
97. Yamashina M, Ueda E, Kinoshita T, et al 1990 Inherited complete deficiency of 20-kilodalton homologous restriction factor (CD59) as a cause of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. New England Journal of Medicine 323:1184–1189.
98. Sirchia G, Ferrone S 1972 The laboratory substitutes of the red cell of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH): PNH-like red cells. Series Haematologica 5:137–175.
99. Francis DA 1983 Production of PNH-like red cells using 2-mercaptobenzoic acid. Medical Laboratory Sciences 40: 33–38.
100. Sirchia G, Marubini E, Mercuriali F, et al 1973 Study of two in vitro diagnostic tests for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. British Journal of Haematology 24: 751–759.
101. Sirchia G, Ferrone S, Mercuriali F 1965 The action of two sulfhydryl compounds on normal human red cells. Relationship to red cells of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Blood 25:502–510.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

12 Investigación de las hemoglobinas anómalas y de las talasemias

Barbara Wild y Barbara J. Bain

La molécula de hemoglobina 233
Variantes estructurales de la hemoglobina 234
- Hemoglobinas con solubilidad reducida 235
- Hemoglobinas inestables 236
- Hemoglobinas con afinidad alterada por el oxígeno 236
- Hb M 236

Síndromes talasémicos 236
- Síndromes β talasémicos 237
- Síndromes α talasémicos 237
- Persistencia de la Hb F en la vida adulta 238

Investigación de pacientes con sospecha de hemoglobinopatía 239
Detección de variantes de la hemoglobina 240
- Recuento y extensión sanguínea 240
- Recogida de sangre y preparación de los hemolizados 240
- Muestras de control 241
- Control de calidad 242
- Electroforesis en acetato de celulosa a pH alcalino 242
- Electroforesis en agar citrato a pH 6,0 244
- Electroforesis en gel de agarosa 245
- Cromatografía en fase líquida de alta resolución automatizada 245
- Isoelectroenfoque 247
- Electroforesis de la cadena de globina 247
- Electroforesis ácida de la cadena de globina, pH 6,3 249

Pruebas para la Hb S 251
- Falciformación en sangre total 251
- Prueba de la solubilidad de la Hb S 251

Detección neonatal 252
Detección de una hemoglobina inestable 252
- Prueba de la estabilidad al calor 253
- Prueba de la estabilidad al isopropanol 253

Detección de la Hb M 253
Detección de hemoglobinas con afinidad alterada 254
Diagnóstico diferencial de las variantes más frecuentes de hemoglobina 254
Investigación de la sospecha de talasemia 254
- Métodos de investigación 255

Cuantificación de la Hb A_2 255
Interpretación de los valores de la Hb A_2 259
Cuantificación de la Hb F 259
- Método de Betke modificado para la estimación de la Hb F 259
- Método de Jonxis y Visser 260
- Inmunodifusión radial 261

Evaluación de la distribución intracelular de la Hb F 261
- Método inmunofluorescente 261
- Interpretación de los valores de la Hb F 262

Evaluación del estado del hierro en la talasemia 263
Inclusiones eritrocitarias 263
- Demostración de los cuerpos de inclusión de la Hb H 263

Diagnóstico fetal de los trastornos del gen de la globina 263

LA MOLÉCULA DE HEMOGLOBINA

La hemoglobina humana está formada por dos pares de cadenas de globina cada una de las cuales lleva unido un grupo hemo. Los sujetos normales sintetizan siete cadenas de globina diferentes; cuatro son hemoglobinas embrionarias transitorias denominadas Hb Gower 1, Hb Gower 2, Hb Portland 1 y Hb Portland 2. La Hb F es la hemoglobina predominante en la vida fetal y representa la mayor proporción de hemoglobina que se encuentra en el momento del nacimiento. La Hb A es la principal hemoglobina encontrada en adultos y en niños. La Hb A_2 y la Hb F se encuentran en pequeñas cantidades en la vida adulta (aproximadamente 2-3,3% y 0,2-1,0%, respectivamente). Las proporciones de adulto de la Hb A, A_2 y F se alcanzan habitualmente a los 6-12 meses de edad.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Las cadenas individuales sintetizadas en la vida posnatal se designan como α, β, γ y δ. La hemoglobina A tiene dos cadenas α y dos cadenas β ($\alpha_2\ \beta_2$); la Hb F tiene dos cadenas α y dos cadenas γ ($\alpha_2\ \gamma_2$) y la Hb A_2 tiene dos cadenas α y dos cadenas δ ($\alpha_2\ \delta_2$). La cadena α es por tanto común a los tres tipos de moléculas de hemoglobina.

La síntesis de la cadena α está dirigida por dos genes α, α1 y α2 en el cromosoma 16 y la síntesis de las cadenas β y δ por genes β y δ únicos en el cromosoma 11. La síntesis de la cadena está dirigida por dos genes γ ($^{G}\gamma$ y $^{A}\gamma$) también en el cromosoma 11. Los genes de la globina se muestran en forma de diagrama en la figura 12.1.

Las cuatro cadenas se asocian en forma de un tetrámero: el contacto $\alpha_1\beta_1$ (y su equivalente $\alpha_2\beta_2$) es el más fuerte y está formado por muchos aminoácidos con muchas cadenas laterales que se enlazan fuertemente; el contacto $\alpha_1\beta_2$ (y su equivalente $\alpha_2\beta_1$) es menos extenso y los contactos entre las cadenas similares son relativamente débiles. La unión de un grupo hemo en la cavidad del hemo de cada cadena es vital para la capacidad transportadora del oxígeno de la molécula y aporta estabilidad a la molécula completa. Si la fijación del hemo se debilita, las cadenas de globina se disocian en dímeros y en monómeros.

Hay muchas variantes de la hemoglobina humana determinadas genéticamente que se producen de forma natural (más de 750)[1] y aunque muchas son inocuas, algunas producen efectos clínicos graves. De forma general, los síndromes clínicos producidos por trastornos de la síntesis de la hemoglobina se denominan «hemoglobinopatías». Pueden agruparse en tres categorías principales:

1. Las que pertenecen a variantes estructurales de la hemoglobina, como la Hb S.
2. Las debidas al fallo en la síntesis en proporciones normales de una o más de las cadenas de globina de la hemoglobina, como en las talasemias.
3. Las debidas a fallos en la sustitución neonatal normal de la hemoglobina fetal (Hb F) por la hemoglobina del adulto (Hb A). Éstas comprenden un grupo de trastornos denominados persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal (PHHF).

Cualquier individuo puede presentar también una combinación de más de una de estas anomalías.

VARIANTES ESTRUCTURALES DE LA HEMOGLOBINA

Las alteraciones de la estructura de la hemoglobina suelen deberse a mutaciones puntuales que afectan a una, o en algunos casos a dos o más, de las bases que codifican a los aminoácidos de las cadenas de globina. Un ejemplo de tal mutación puntual es la Hb S, originada por la sustitución del ácido glutámico en la posición 6 de la cadena de la globina β por valina ($\beta 6^{Glu \rightarrow Val}$). Menos frecuentemente, el cambio estructural está causado por el acortamiento o el alargamiento de la cadena de globina. Por ejemplo, en la cadena β de la Hb Gun Hill faltan cinco aminoácidos, mientras que en la Hb Constant Spring hay 31 aminoácidos añadidos a la cadena α. Las mutaciones relacionadas con un cambio en la secuencia básica de nucleótidos pueden originar también la síntesis de una hemoglobina estructuralmente anómala, que puede ser más corta o más larga de lo normal. También puede haber combinaciones de los segmentos de las cadenas β y γ o δ que darán lugar a hemoglobinas híbridas; las combinaciones de β y δ se conocen como hemoglobinas Lepore y anti-Lepore, respectivamente.

Muchas variantes de las hemoglobinas son silentes desde el punto de vista hematológico y clínico, porque la mutación subyacente no causa alteraciones en la función, la solubilidad o la estabilidad de la molécula de hemoglobina. Muchas de estas variantes se separan por medio de la electroforesis o la cromatografía, pero algunas no se separan y permanecen sin detectar. Algunas variantes estructurales se asocian con fenotipos clínicos graves en estado homocigótico o incluso heterocigótico; estas mutaciones afectan a las propiedades físicas o químicas de la molécula de hemoglobina, produciendo cambios en la solubilidad, en la estabilidad o en las propiedades de fijación de oxígeno de la hemoglobina. Algunas de estas variantes se separan por medio de electroforesis o de cromatografía, mientras que otras no lo hacen. Afortunadamente, las variantes

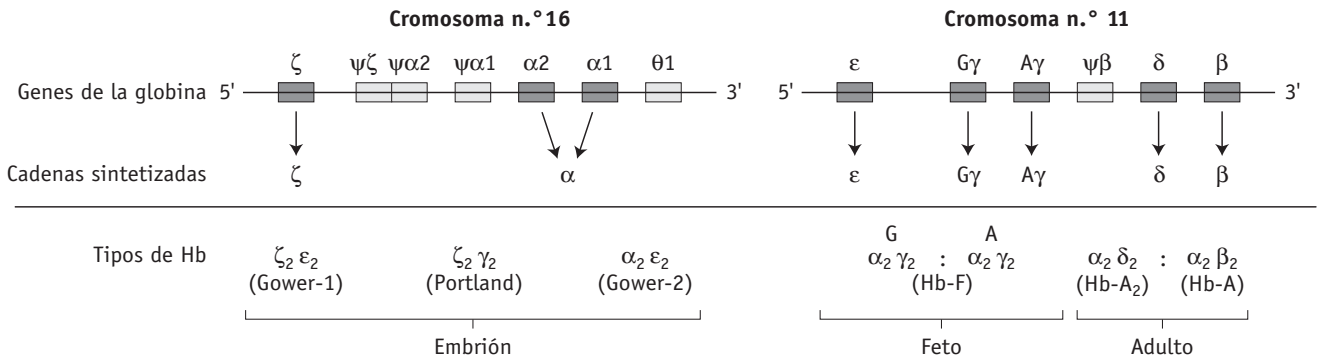


Figura 12.1. Localización del grupo de genes de la globina α en el cromosoma 16 y del grupo de genes de la globina β en el cromosoma 11. Las cajas negras representan genes funcionales. Los genes de la globina α y γ están duplicados; los dos genes de la globina α tienen el mismo producto, mientras que los productos de los dos genes de la globina γ son ligeramente diferentes ($^{G}\gamma$ = γ 136Gly; $^{A}\gamma$ = γ 136Ala).

Tabla 12.1. Síndromes clínicos encontrados con las variantes β^S y β^C

Hb	Genotipo	Nombre	Problemas clínicos
S	β^A/β^S	Rasgo de células falciformes	Ninguno
	β^S/β^S	Anemia de células falciformes	Anemia hemolítica grave, episodios vasooclusivos
C	β^A/β^C	Rasgo C	Ninguno
	β^C/β^C	Enfermedad C	Anemia ligera ocasional, incidencia aumentada de cálculos en la vesícula biliar
D^{Punjab}	β^A/β^D	Rasgo D	Ninguno
	β^D/β^D	Enfermedad D	Anemia ligera ocasional
O^{Arab}	$\beta^A/\beta^{O\ Arab}$	Rasgo O	Ninguno
	$\beta^{O\ Arab}/\beta^{O\ Arab}$	Enfermedad O	Anemia hemolítica
Interacciones	β^S/β^C	Enfermedad SC	Anemia ligera, problemas vasooclusivos
	$\beta^S/\beta^{D\ Punjab}$	Enfermedad SD	Como para la anemia de células falciformes
	$\beta^S/\beta^{O\ Arab}$	Enfermedad SO	Como para la anemia de células falciformes
	β^{0tal}/β^S	Falciformación-tal β^0	Como para la anemia de células falciformes
	β^{+tal}/β^S	Falciformación-tal β^+	Enfermedad de las células falciformes leve
	β^{tal}/β^C	C/tal β	Anemia hemolítica leve
	β^{tal}/β^D	D/tal β	Anemia hemolítica leve
	$\beta^{tal}/\beta^{O\ Arab}$	O/tal β	Talasemia intermedia

de la hemoglobina común con importancia clínica o genética (p. ej., Hb S, C, D^{Punjab}, E y O^{Arab}) son fácilmente detectables con las técnicas electroforéticas y cromatográficas.

Hemoglobinas con solubilidad reducida

Hb S

Con mucho, la variante de la hemoglobina más habitual en este grupo es la hemoglobina falciforme o Hb S. Como resultado de la sustitución del ácido glutámico por la valina en la posición 6 de la cadena β, la Hb S tiene una escasa solubilidad en estado desoxigenado y puede formar polímeros en el interior de los hematíes. El eritrocito muestra un cambio característico en su forma debido a la formación de polímeros y se vuelve rígido y distorsionado, dando lugar a la denominada *célula en hoz* (v. pág. 89, fig. 5.72). Además, los polímeros intracelulares ocasionan cambios en la membrana eritrocitaria, producción de sustancias oxidantes y una adherencia anómala de los hematíes al endotelio vascular. Los síndromes clínicos asociados con las variantes estructurales habituales y aquellos debidos a su interacción con la talasemia β se muestran en la tabla 12.1.

Enfermedad de las células falciformes

La enfermedad (también llamado trastorno) de las células falciformes[2] es un nombre colectivo para un grupo de trastornos que originan síntomas clínicos caracterizados por la formación de hematíes falciformes. Es habitual en las personas provenientes de África, pero también se encuentra en cantidades considerables de personas de origen indio, árabe y griego.

El *estado homocigoto* o *anemia de células falciformes* (genotipo β SS) causa una anemia hemolítica moderada o grave. La principal discapacidad clínica surge de los episodios repetidos de oclusión vascular por parte de los hematíes falciformes, que producen crisis agudas con resultado final de daño orgánico. La gravedad clínica de la anemia de células falciformes es extremadamente variable. Se debe parcialmente a los efectos de los factores modificadores hereditarios, como la interacción con la talasemia β o el aumento de la síntesis de Hb F y, parcialmente, a las condiciones socioeconómicas y a otros factores que afectan a la salud general[2].

El rasgo falciforme (genotipo β S), correspondiente al estado heterocigoto, es muy habitual, y afecta a millones de personas en el mundo entero. No se asocia a anomalías hematológicas. La falciformación *in vivo* sólo se presenta a altitudes muy elevadas y a bajas presiones de oxígeno. La hematuria espontánea, debida a la falciformación en las papilas renales, se encuentra en cerca del 1% de las personas con rasgo falciforme.

Otras formas de enfermedad de las células falciformes

La *enfermedad de las células falciformes/Hb C* es un estado heterocigoto mixto de las Hb S y C. La abreviatura «enfermedad SC» es ambigua y debería evitarse; sin embargo, el término enfermedad de la Hb SC es aceptable. Este estado heterocigoto mixto genera habitualmente una forma más leve de enfermedad de las células falciformes.

La β *talasemia/anemia de células falciformes* surge como resultado de la herencia de un gen de Hb S y uno de talasemia β. Los africanos y los afrocaribeños con este trastorno son, a menudo, heterocigotos para una talasemia leve con un alelo β^+, que da como resultado la producción de cerca de un 20% de Hb A. Esto ocasiona un trastorno de falciformación leve. La herencia de la Hb S y del rasgo talasémico β^0 se asocia con una enfermedad de las células falciformes grave. La interacción de la Hb S con la hemoglobina D^{Punjab} (Hb $D^{Los\ Angeles}$) o con la Hb O^{Arab} da lugar a una enfermedad de las células falciformes grave[2].

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Hb C

La Hb C es la segunda variante estructural de la hemoglobina más habitual en las personas de origen africano. La sustitución del ácido glutámico en la posición 6 de la cadena β por la lisina produce una molécula de hemoglobina con una carga altamente positiva, una solubilidad reducida y una tendencia a la cristalización. Sin embargo, la Hb C no da resultado positivo en la prueba de solubilidad para la Hb S. Los heterocigotos son asintomáticos, pero en las extensiones sanguíneas pueden hallarse células diana y células irregularmente contraídas. Los homocigotos pueden tener una anemia leve con numerosas células diana y células irregularmente contraídas (v. pág. 79, fig. 5.32). La interacción con el rasgo talasémico β^0 y β^+ produce una anemia hemolítica leve o moderada.

Otras hemoglobinas falciformes

Además de la Hb S, hay nueve hemoglobinas (Hb $S^{Antilles}$, Hb $C^{Ziquinchor}$, Hb C^{Harlem}, Hb $S^{Providence}$, Hb S^{Oman}, Hb S^{Travis}, Hb $S^{South\ End}$, Hb $S^{Jamaica\ Plain}$, Hb $S^{Cameroon}$) que presentan una mutación del ácido glutámico en la posición β6 por la valina junto con una mutación puntual adicional en la cadena de la globina β. Estas hemoglobinas dan también positivo en la prueba de la solubilidad porque tienen una solubilidad reducida, aunque presentan, por lo general, propiedades electroforéticas y cromatográficas diferentes de la Hb S. Tienen un significado clínico similar, aunque no necesariamente idéntico, a la Hb S: por ejemplo, la Hb $S^{Antilles}$ se asocia con una tendencia a la falciformación mayor que la Hb S.

Hemoglobinas inestables

Las sustituciones de los aminoácidos cercanos al grupo hemo, o en los puntos de contacto entre las cadenas de globina, pueden afectar a la estabilidad de la proteína y producir una precipitación intracelular de las cadenas de globina. Las cadenas de globina precipitadas se unen a la membrana eritrocitaria dando lugar a los cuerpos de Heinz, y los síndromes clínicos asociados se denominaron originariamente *anemias hemolíticas congénitas con cuerpos de Heinz*. Los cambios en las propiedades de la membrana pueden producir una hemólisis, a menudo agravada por los fármacos oxidantes. Hay una heterogeneidad considerable en los efectos clínicos y hematológicos de las hemoglobinas inestables. Muchas son casi silenciosas y sólo se detectan mediante pruebas específicas, mientras que otras son graves y originan una anemia hemolítica en el estado heterocigoto. La Hb Köln es la variante más habitual de este raro grupo de trastornos[3,4].

Hemoglobinas con afinidad alterada por el oxígeno

Las variantes de la hemoglobina con afinidad alterada por el oxígeno son un grupo raro de variantes que tienen como consecuencia una mayor o menor afinidad por el oxígeno[5]. Las mutaciones que *aumentan* la afinidad por el oxígeno se asocian generalmente con una eritrocitosis benigna durante toda la vida. Puede confundirse con una policitemia vera y ser inadecuadamente tratada con fármacos citotóxicos o con P^{32}.

A excepción de la Hb S, las variantes de la hemoglobina con afinidad *reducida* por el oxígeno son aún menos frecuentes y se asocian, por lo general, con anemia y cianosis leve. Sin embargo, dada la reducida afinidad por el oxígeno, estos pacientes no son funcionalmente anémicos a pesar de la Hb reducida. El bajo equilibrio estacionario de la concentración de la hemoglobina en los individuos homocigotos para la Hb S es, al menos en parte, el resultado de su afinidad reducida.

La medición de la disociación del oxígeno se describe en la página 200.

Hb M

El grupo de la Hb M es otro grupo de variantes raras[6]. Tales hemoglobinas tienen la tendencia de formar metahemoglobina, generada por la oxidación del hierro ferroso del grupo hemo en hierro férrico, que es incapaz de fijar el oxígeno. A pesar de una cianosis marcada, da pocos problemas clínicos. La mayoría se asocian a sustituciones que desorganizan el estado normal de seis ligandos del hierro hemo.

La metahemoglobinemia se encuentra también en el déficit congénito de NADH metahemoglobina reductasa, así como tras la exposición a fármacos y a productos químicos oxidantes (nitratos, nitritos, quinonas, cloratos, fenacetina, dapsona y muchos otros).

SÍNDROMES TALASÉMICOS

Los síndromes talasémicos[7] son un grupo heterogéneo de trastornos hereditarios caracterizados por defectos en la síntesis de una o más de las cadenas de globina que forman el tetrámero de la hemoglobina. Los síndromes clínicos asociados con las talasemias surgen de las consecuencias combinadas de una producción inadecuada de hemoglobina junto con una acumulación desequilibrada de un tipo de cadena de globina. La primera origina una anemia con hipocromía y microcitosis, mientras que la última produce una eritropoyesis ineficaz y hemólisis. Las manifestaciones clínicas varían desde una microcitosis completamente asintomática hasta una anemia grave que es incompatible con la vida y que puede causar la muerte intrauterina (tabla 12.2). Esta heterogeneidad clínica es el resultado de la variabilidad en la gravedad del defecto genético primario en la síntesis de la hemoglobina y de la herencia concomitante de los factores moduladores, tales como la capacidad de sintetizar cantidades aumentadas de Hb F.

Las talasemias se heredan generalmente como alelos de uno o más genes de la globina, que se localizan ya sea en el cromosoma 11 (para las cadenas β, γ y δ) o en el cromosoma 16 (para las cadenas α). Se encuentran en cualquier

Tabla 12.2. Síndromes clínicos de talasemia

Clínicamente asintomática
Portadores silenciosos
Rasgo talasémico α (algunos casos)
Formas raras de rasgo talasémico β
Talasemia menor (HCM y VCM bajos, con o sin anemia leve)
Rasgo talasémico α^+ (algunos casos)
Rasgo talasémico α^0
Homocigotos α^+/α^+
Rasgo talasémico β^0
Rasgo talasémico β^+
Rasgo talasémico β
Algunos casos de Hb E/talasemia β
Talasemia intermedia (independiente de transfusiones)
Algunos homocigotos para talasemia β^+/β^+
Interacción de los β^0/β^0, β^0/β^+ o β^+/β^+ con talasemia α
Interacción de los β^0/β o β^+/β con triple α
Enfermedad de la Hb H
Talasemia α^0/Hb Constant spring
Heterocigotos compuestos de la talasemia $\beta^0/\delta\beta$ o $\beta^+/\delta\beta$
Talasemia δβ/δβ
Algunos casos de Hb E/talasemia β y Hb Lepore/talasemia β
Casos raros de heterocigotos para la mutación de la talasemia β, sobre todo la que afecta al exón 3 («talasemia β dominante»)
Talasemia mayor (dependiente de transfusiones)
Talasemia β^0/β^0
Talasemia β^+/β^+
Talasemia β^0/β^+
Algunos casos de talasemia β^0/Hb Lepore y β^+/Hb Lepore
Algunos casos de talasemia β^0/Hb E y β^+/Hb E

HCM, hemoglobina corpuscular media; VCM, volumen corpuscular medio.

población mundial pero son más comunes en el litoral mediterráneo y cerca de las regiones ecuatoriales de África y de Asia. Las frecuencias de los genes para las talasemias α y β, en términos globales, varían del 1% a más del 80% en aquellas áreas donde el paludismo es endémico[8].

Síndromes β talasémicos

Existen muchas mutaciones diferentes que causan una talasemia β y trastornos relacionados[9]. Estas mutaciones pueden afectar a cada uno de los pasos en la ruta de la expresión del gen de la globina: transcripción, procesado del precursor del ácido ribonucleico mensajero (ARNm), traducción del ARNm maduro y preservación de la integridad postraducción de la cadena β. Se han descrito más de 200 mutaciones[10]. La mayoría de los tipos de talasemia β son el resultado de mutaciones puntuales que afectan al gen de la globina, pero también se conocen grandes deleciones. Algunas comunidades presentan ciertas mutaciones particularmente habituales. Sirven de ayuda para simplificar el diagnóstico prenatal, que se realiza por la detección o la exclusión de una mutación particular en el ADN fetal.

El efecto de las distintas mutaciones varía enormemente. En un extremo del espectro se encuentra un grupo de mutaciones raras, que afectan principalmente al exón 3 del gen de la globina β, y que son tan graves que pueden producir el síndrome clínico de las talasemias intermedias en el estado heterocigoto. En el otro extremo están los alelos leves, que producen las talasemias intermedias en el estado homocigoto o en el heterocigoto complejo, y algunas tan leves que son completamente silentes desde el punto de vista hematológico, con un volumen corpuscular medio (VCM) y una Hb A_2 normales en el estado heterocigoto. En el centro se sitúan la gran mayoría de alelos β^+ y β^0, que ocasionan la talasemia β mayor en los estados homocigoto o heterocigoto complejo, y que en el estado heterocigoto dan lugar a una anemia ligera (o con la Hb en el extremo inferior del intervalo de normalidad), con índices microcíticos e hipocrómicos y con una Hb A_2 elevada[11].

La *talasemia β mayor* es una anemia hereditaria grave, dependiente de las transfusiones. Hay un defecto importante en la producción de la cadena β. Las cadenas α en exceso se acumulan y precipitan en los precursores eritrocitarios de la médula ósea originando una eritropoyesis ineficaz. Las pocas células que abandonan la médula ósea están repletas de cadenas α precipitadas y son rápidamente eliminadas por el sistema reticuloendotelial. El constante estímulo eritropoyético produce una expansión masiva de la médula ósea y una eritropoyesis extramedular. Si no se tratase, el 80% de los niños con talasemia β morirían en los primeros 5 años.

Los *heterocigotos para alelos de la talasemia* β cursan habitualmente con una hemoglobina normal con microcitosis o una anemia hipocrómica microcítica leve; la Hb A_2 está elevada y la Hb F está a veces también elevada. Las características de laboratorio de los diversos síndromes de la talasemia β se muestran en la tabla 12.3.

Síndromes α talasémicos[12]

Hay cuatro síndromes α talasémicos: rasgo talasémico α^+, en el que no hay funcionalidad de uno de los dos genes de la globina en un único cromosoma; rasgo talasémico α^0, en el que no hay funcionalidad de ninguno de los dos genes en un único cromosoma; enfermedad de la Hb H con tres genes afectados, y el hidrops fetal con Hb Bart, cuando los cuatro genes son defectuosos. Estos síndromes son, por lo general, el resultado de las deleciones de uno o más genes, aunque aproximadamente el 20% de las mutaciones descritas no son delecionales. La talasemia α^+ es particularmente frecuente en África mientras que la talasemia α^0 lo es en el sudeste asiático. Las características de laboratorio se muestran en la tabla 12.3.

El *hidrops fetal por Hb Bart* se presenta principalmente en las personas del sudeste asiático, aunque también se observa, en ocasiones, en las poblaciones de Grecia, Turquía y Chipre. El feto afectado nacerá muerto o morirá al poco tiempo del nacimiento. La anemia y el edema graves son característicos de este trastorno. Las mujeres con un feto hidrópico tienen una elevada incidencia de complicaciones

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 12.3. Pruebas de laboratorio en las talasemias

Fenotipo	Genotipo	VCM habitual	HCM habitual	Hb A_2	Inclusiones Hb H
α *Talasemia*					
Rasgo talasémico α	-α/αα (α^+/α)	N	N	N o ↓	-
Rasgo talasémico α	-α/-α o –/αα	N o ↓	N o ↓	N o ↓	+
Enfermedad de la Hb b					
Leve	–/-α ($\alpha^o/\alpha+$)	↓	↓	N o ↓	+++
Grave	–/$\alpha^T\alpha$ (α^o/α^T)	↓	↓	N o ↓	+++
Hidrops fetal por Hb Bart (Talasemia α mayor)	–/– (α^o/α^o)	↓	↓	–	-
β *Talasemia*					
Rasgo talasémico β	β^o/β o β^+/β	↓	↓	↑	-
Rasgo talasémico δβ	$\delta\beta^o/\beta$	↓	↓	N o ↓	-
Rasgo talasémico β con Hb A_2 normal	β^+/β	↓	↓	N	-
Rasgo de la Hb Lepore	Hb Lepore/β	↓	↓	N o ↓	-
Talasemia β intermedia	Heterogénea	↓	↓	↑, N o ↓	-
Talasemia β mayor	β^o/β^o, β^o/β^+, β^+/β^+	↓	↓	↑, N o ↓	

HCM, hemoglobina corpuscular media; N, normal; VCM, volumen corpuscular medio.

en el embarazo. Se debe realizar el diagnóstico prenatal a las mujeres con riesgo de tener un feto afectado de hidrops fetal con Hb de Bart.

La *enfermedad de la Hb H* da lugar a una anemia hemolítica; en raras ocasiones, los pacientes requieren una transfusión o una esplenectomía.

El *rasgo talasémico* α^0 se caracteriza por índices microcíticos e hipocrómicos. El valor de la hemoglobina puede ser normal o estar ligeramente reducido. Es posible que el rasgo talasémico α^+ sea completamente silente o que exista una microcitosis en el borde de la normalidad con una concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) normal o ligeramente reducida. Hematológicamente, la homocigosidad para el rasgo talasémico α^+ se parece a la heterocigosidad para el rasgo talasémico α^0, pero las implicaciones genéticas son muy distintas. Tanto el rasgo talasémico α^+ como el α^0 son más difíciles de diagnosticar que el rasgo talasémico β porque no existe la elevación característica de la Hb A_2 y es frecuente que no se puedan demostrar los cuerpos de inclusión por Hb H. El diagnóstico definitivo del rasgo talasémico α se realiza de forma fiable mediante el uso de técnicas de ADN o con los estudios de biosíntesis de la cadena de globina.

Variantes talasémicas estructurales

Son hemoglobinas anómalas caracterizadas por un defecto en su biosíntesis y una estructura anómala; un ejemplo son las hemoglobinas Lepore (tabla 12.4).

Persistencia de la Hb F en la vida adulta

La producción de hemoglobina en el hombre se caracteriza por dos sustituciones principales en la composición de la hemoglobina eritrocitaria. Durante los primeros 3 meses de la gestación, los hematíes humanos contienen hemoglobinas embrionarias (v. pág. 234), mientras que durante los últimos 6 meses de la gestación, la hemoglobina que contienen es predominantemente la fetal. La principal transición de la síntesis de hemoglobina fetal a la de adulto se produce en el período perinatal y, hacia el final del primer año de vida, los hematíes tienen ya una composición de hemoglobinas que permanece generalmente constante durante la vida de adulto. En ese momento, la principal hemoglobina es la Hb A, pero hay pequeñas cantidades de Hb A_2 y de Hb F. Únicamente el 0,2-1,0% de la hemoglobina total en los hematíes humanos es Hb F y está restringida a unas pocas células denominadas células «F». Tanto el número de células F como la cantidad de Hb F por célula pueden estar aumentados en diversos trastornos, sobre todo si hay una regeneración rápida de la médula ósea[13].

La organización general de los grupos de genes de la globina humana se muestra en la figura 12.1. Los productos de los dos genes γ difieren únicamente en un aminoácido: $^G\gamma$ tiene glicina en la posición 136, mientras que $^A\gamma$ tiene alanina. En los hematíes fetales, la proporción de $^G\gamma$ con respecto a $^A\gamma$ es, aproximadamente, 3:1; en los hematíes adultos es alrededor de 2:3.

En los últimos años ha habido mucho interés en los intentos de manipular la sustitución fetal de forma farmacológica. Si fuera posible reactivar la síntesis de Hb F más allá del período perinatal, se produciría una mejora tanto de la talasemia β mayor como de la enfermedad de las células falciformes.

Anomalías hereditarias que aumentan la concentración de Hb F

Se han descrito más de 50 mutaciones que aumentan la síntesis de Hb F[13,14]. Dan como resultado uno de los dos fenotipos siguientes: la PHHF o la talasemia δβ. La diferenciación entre estos dos tipos no siempre es sencilla, pero

Tabla 12.4. Variantes talasémicas estructurales[a]

Hemoglobina	Estructura	Si heterocigótica	Si homocigótica	En combinación con otras hemoglobinopatías[17,18]
Lepore	Combinación de cadenas δ y β debido a un entrecruzamiento no equilibrado	Microcitosis, anemia leve	Talasemia mayor o intermedia	Con talasemia β tiene como resultado talasemia mayor o intermedia
E[b]	$\beta^{26Glu \rightarrow Lys}$ que produce un ARN mensajero anómalo	Microcitosis, anemia leve	Microcitosis, anemia leve	Con talasemia β tiene como resultado talasemia mayor o intermedia
Constant Spring	Cadena α elongada debido a la incorporación de 31 aminoácidos extra	Microcitosis, anemia leve	Microcitosis, anemia leve	Con α^o da la enfermedad de la Hb H

[a] Se han descrito muchas otras variantes talasémicas estructurales, pero son mucho más raras que las tres mostradas en esta tabla.
[b] Frecuencia del 13 al 30% en Camboya, Tailandia, Vietnam y algunas partes de China.

tiene su importancia clínica. En general, la PHHF tiene un porcentaje mayor de Hb F y una síntesis de las cadenas mucho más equilibrada. La más habitual, el tipo africano de la PHHF, se asocia con una concentración elevada de Hb F (15-45%), con una distribución pancelular de Hb F en la tinción de Kleihauer y con unos índices eritrocíticos normales. Las mutaciones que causan una síntesis aumentada de Hb F son principalmente deleciones, pero también se han descrito algunas mutaciones no debidas a deleción. En cambio, los sujetos con talasemia δβ tienen niveles inferiores de Hb F acompañados de índices microcíticos e hipocrómicos. La importancia clínica principal de estas anomalías es su interacción con la talasemia β y la Hb S. Los heterocigotos compuestos para cualquiera de estos trastornos y para la PHHF tienen síndromes clínicos mucho más leves que los homocigotos para la hemoglobina S o para la talasemia β. Los heterocigotos compuestos para cualquiera de estos trastornos y para la talasemia δβ tienen un trastorno similar en gravedad al de los homocigotos.

El aumento de Hb F se encuentra también en muchos otros trastornos hematológicos, incluyendo la aplasia eritrocitaria congénita y la anemia aplásica congénita (anemias de Blackfan-Diamond y de Fanconi, respectivamente), la leucemia mielomonocítica crónica juvenil (anteriormente denominada leucemia mieloide crónica juvenil) y algunos síndromes mielodisplásicos. Un aumento de la Hb F, pequeño pero significativo, puede ocurrir en presencia de un estrés eritropoyético (hemólisis, hemorragia, recuperación de una insuficiencia aguda de la médula ósea) y en el embarazo.

INVESTIGACIÓN DE PACIENTES CON SOSPECHA DE HEMOGLOBINOPATÍA

La investigación de una persona con riesgo de hemoglobinopatía incluye la confirmación o la exclusión de la presencia de una variante estructural, de un rasgo talasémico o de ambos. Si existe una variante estructural de la hemoglobina, es necesario verificar la importancia clínica de la variante particular, de forma que se pueda tratar adecuadamente al paciente. Si se confirma la presencia de un rasgo talasémico, no es necesario, habitualmente, determinar la mutación precisa exacta porque la importancia clínica es, por lo general, insignificante. La excepción la constituye una paciente embarazada en cuyo compañero se haya encontrado también un rasgo talasémico. Si se considera conveniente el diagnóstico prenatal, puede ser necesario abordar un análisis mutacional para predecir, de forma exacta, el riesgo fetal y facilitar el diagnóstico prenatal (v. pág. 272).

Ya que la herencia de una hemoglobinopatía *per se* tiene implicaciones genéticas, es importante que estos pacientes dispongan de un consejo genético.

En la mayoría de los pacientes, se puede diagnosticar la presencia de una hemoglobinopatía con precisión suficiente para fines clínicos a partir del conocimiento del origen étnico del paciente, de los antecedentes clínicos (incluyendo los antecedentes familiares) y de los resultados del examen físico combinados con pruebas hematológicas relativamente sencillas. Las investigaciones iniciales deben incluir la determinación de la concentración de hemoglobina y los índices eritrocitarios. Se debe realizar un examen detallado de una extensión sanguínea bien teñida. En algunos casos, el recuento de reticulocitos y la búsqueda de inclusiones eritrocitarias dan una información valiosa. A veces es necesario evaluar el estado del hierro mediante la estimación del hierro sérico y de la capacidad de fijación del hierro total y/o de la ferritina sérica para excluir el déficit de hierro. Otras pruebas básicas importantes son la electroforesis o la cromatografía de la hemoglobina, la prueba de la solubilidad de la hemoglobina y las mediciones del porcentaje de la Hb A_2 y de la Hb F. En los casos de variantes comunes de la hemoglobina y del rasgo talasémico β clásico, los datos exactos de estas pruebas facilitarán un diagnóstico fiable sin necesidad de realizar investigaciones más sofisticadas. Sin embargo, el diagnóstico definitivo de algunos síndromes talasémicos sólo puede rea-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

lizarse utilizando la tecnología del ADN (v. pág. 478). De forma similar, en situaciones particulares, las variantes de la hemoglobina precisarán su identificación inequívoca mediante el uso de la tecnología de ADN o el análisis de las proteínas por espectrometría de masas[15]. Los individuos o las familias que requieren tales investigaciones deben ser cuidadosamente seleccionados sobre la base de los antecedentes familiares y los resultados de las investigaciones básicas descritas más adelante en este capítulo. En algunos países donde no se dispone de antecedentes de casos individuales ni de resultados de otras pruebas de laboratorio, se están llevando a cabo cada vez más programas de detección a gran escala. Los problemas de tales programas se analizan en la página 255.

La mayoría de los errores que se producen en la detección e identificación de una hemoglobinopatía son el resultado de un fallo en la obtención de los datos de laboratorio correctos o de un fallo en la interpretación correcta de esos mismos datos. En este capítulo se propone una secuencia de investigaciones basada en procedimientos que deberían poder realizarse en el laboratorio de cualquier hospital importante. La cromatografía en fase líquida de alta resolución (HPLC) automatizada está reemplazando progresivamente a la electroforesis de la hemoglobina como el procedimiento inicial de investigación en los laboratorios que analizan grandes cantidades de muestras. El isoelectroenfoque (IEF) se utiliza, en general, de forma limitada, principalmente para la detección neonatal o en laboratorios especializados. Aquí se describirá brevemente.

La investigación de laboratorio de una sospecha de hemoglobinopatía debe seguir un protocolo definido, diseñado para ajustarse a los requisitos locales individuales. Los datos obtenidos de los hallazgos clínicos, el cuadro sanguíneo y la electroforesis o la HPLC indicarán habitualmente la dirección que se debe seguir. La investigación de una variante estructural se describe en la primera sección de este capítulo y la de la sospecha de un síndrome talasémico, en la segunda sección. Las pruebas de detección del rasgo talasémico y del rasgo de la hemoglobina E, que pueden ser especialmente aplicables en las áreas con pocos recursos, se describen en el capítulo 27.

DETECCIÓN EN EL LABORATORIO DE LAS VARIANTES DE LA HEMOGLOBINA

En la figura 12.2 se muestra el esquema propuesto de investigación y a continuación enumeramos una relación de los procedimientos[15,16]:

1. Recuento sanguíneo y examen de la extensión.
2. Recogida de sangre y preparación de los hemolizados.
3. Electroforesis en acetato de celulosa, tampón Tris a pH 8,5 (v. pág. 242).
4. Electroforesis en agar citrato o en gel de agarosa ácida a pH 6,0 (v. pág. 244).
5. HPLC automatizada (v. págs. 244 y 245).
6. IEF (v. pág. 245).
7. Electroforesis de la cadena de globina a pH 8,0 y 6,3 (v. págs. 247-249).
8. Pruebas para la Hb S (v. pág. 251).
9. Detección de las hemoglobinas inestables (v. pág. 252).
10. Detección de la Hb Ms (v. pág. 253).
11. Detección de las hemoglobinas con afinidad alterada (v. pág. 254).
12. Diferenciación de las variantes estructurales comunes (v. pág. 255).
13. Detección neonatal (v. pág. 252).
14. Pruebas, como el cálculo de la protoporfirina de cinc, para excluir el déficit de hierro como causa de la microcitosis (v. cap. 7).
15. Técnicas moleculares (v. cap. 21).
16. Procedimientos para utilizar en laboratorios con pocos recursos (v. cap. 27).

Recuento y extensión sanguínea

El recuento sanguíneo, incluyendo la Hb y los índices eritrocitarios, proporciona una información valiosa y útil para el diagnóstico de las interacciones de las talasemias α y β con las variantes estructurales (v. cap. 3). El examen de la extensión sanguínea puede revelar cambios eritrocíticos característicos como las células diana en el rasgo de la Hb C, las células falciformes en la enfermedad de las células falciformes y las células irregularmente contraídas en presencia de una hemoglobina inestable (v. cap. 5).

Se han propuesto funciones discriminadoras utilizando diversas fórmulas como base para las pruebas posteriores de la talasemia[17,18] pero no aconsejamos su utilización. Aunque tales funciones y fórmulas indican si hay una mayor probabilidad de talasemia o de déficit de hierro, puede ocurrir que los individuos que tengan tanto un déficit de hierro como un rasgo talasémico no sean sometidos puntualmente a las pruebas. Por lo general, esto no es un problema y, de hecho, puede ser preferible mantener al paciente en observación hasta que se haya tratado el déficit de hierro y después reevaluar la posibilidad de presentación del rasgo talasémico. Sin embargo, muchos de los pacientes que requieren pruebas para la talasemia son mujeres que ya están embarazadas. En tales pacientes no es aceptable el posible retraso en la realización de las pruebas. Por otra parte, no parece que estas fórmulas hayan sido validadas para su utilización durante el embarazo. Por estas razones, aconsejamos que cada vez que se requiera el asesoramiento genético, se realicen las pruebas para la β talasemia en todos los individuos con una HCM menor de 27 pg y se haga la detección del rasgo talasémico α en aquellos individuos con una HCM inferior a los 25 pg y pertenecientes a un grupo étnico en el que la talasemia α^0 sea prevalente[11].

Recogida de sangre y preparación de los hemolizados

El EDTA es el anticoagulante más apropiado porque se utiliza para el recuento inicial de la sangre total y la exten-

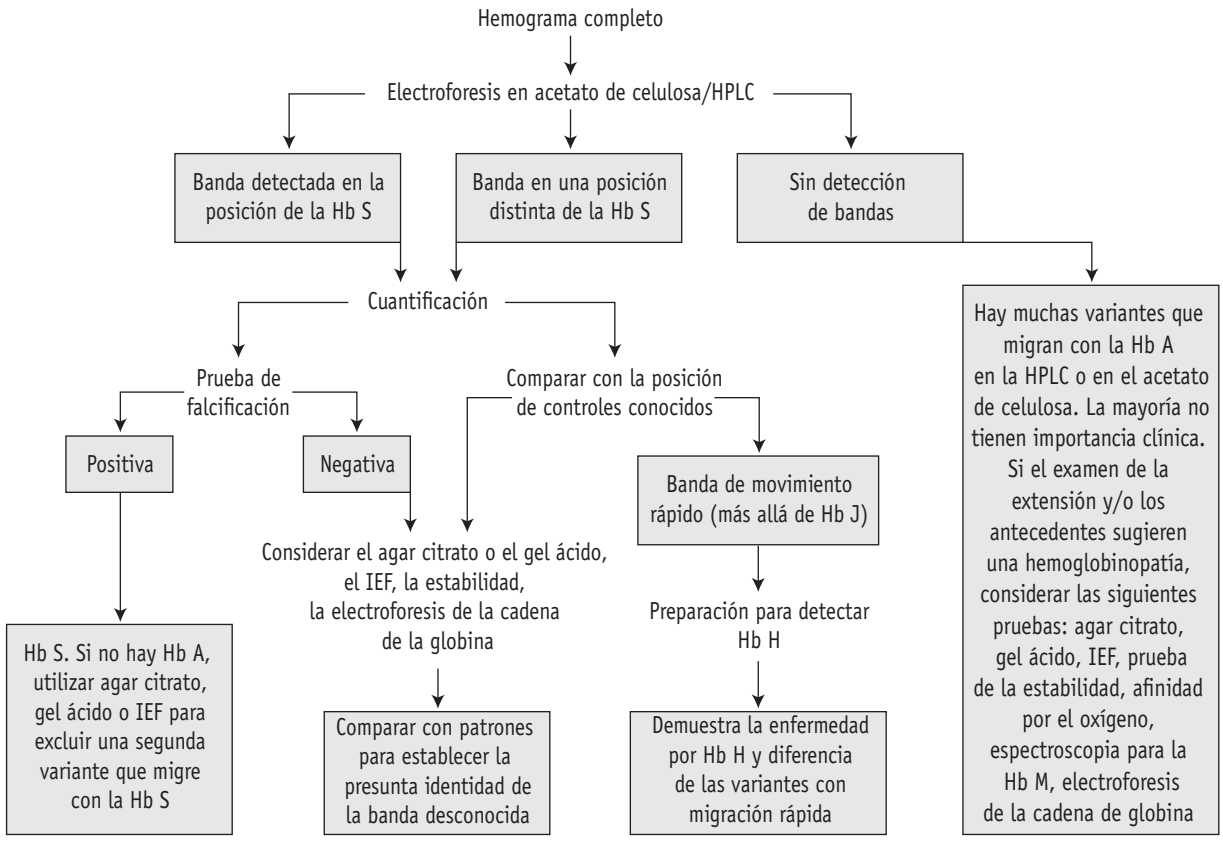


Figura 12.2. **Esquema sugerido para la investigación de las variantes estructurales.**

sión de la misma (v. cap. 1), aunque son satisfactorias las muestras recogidas en cualquier anticoagulante. También se pueden utilizar las células obtenidas de la sangre coagulada.

Preparación del hemolizado para la electroforesis cualitativa de la hemoglobina

Véanse los métodos individuales.

Preparación del hemolizado para las pruebas de estabilidad y de cuantificación de las hemoglobinas

La preparación del hemolizado para las pruebas de estabilidad y de cuantificación de las hemoglobinas puede utilizarse para la electroforesis cualitativa y, si es necesario, para la cuantificación de la Hb A_2 y de la F o de las variantes de la hemoglobina por elución. Es también esencial para la fiabilidad de las pruebas de estabilidad y de la electroforesis de la globina.

Lisar 2 volúmenes de concentrado de hematíes lavados en 1 volumen de agua destilada y añadir a continuación 1 volumen de tetracloruro de carbono (CCl_4). Como alternativa, lisar por congelación y descongelación y añadir después 2 volúmenes de CCl_4. Agitar los tubos vigorosamente durante aproximadamente 1 min y centrifugar después a 1.200 g (3.000 rpm) durante 30 min a 4 °C. Transferir el sobrenadante a un contenedor limpio de muestras y ajustar la Hb a 100 ± 10 g/l con agua. Si hay sospecha de una hemoglobina inestable, se deben evitar los disolventes orgánicos.

Nota. Las muestras de sangre total se almacenan mejor en forma de concentrados de hematíes lavados y congelados en forma de gotitas en nitrógeno líquido para posteriormente almacenarlas a –20 °C, a –70 °C o en nitrógeno líquido. De forma alternativa, los hemolizados pueden también congelarse a –20 °C, a –70 °C o en nitrógeno líquido.

Muestras de control

La interpretación de los patrones de migración de las muestras problema se realiza mediante comparación con la migración y la separación de hemoglobinas anómalas conocidas utilizadas como materiales de control. De forma ideal, se debe incluir una mezcla de hemoglobinas A, F, S y C en cada separación electroforética. Este material puede prepararse de la siguiente forma:

1. El control puede hacerse a partir de la combinación de una muestra de rasgo falciforme (Hb A + Hb S) combinada con una muestra del rasgo de la Hb C (Hb A + Hb C) y sangre normal del cordón umbilical (Hb F + Hb A) o a partir de la combinación de sangre normal del cordón umbilical con una muestra de una persona con enfermedad de la Hb SC (Hb S + Hb C).

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

2. Preparar los lisados mediante el método dado para el hemolizado purificado.
3. Mezclar volúmenes iguales de los lisados conjuntamente y añadir unas cuantas gotas de KCN 0,3 mol/l (20 g/l).
4. Analizar las muestras mediante electroforesis para valorar su calidad.
5. Hacer partes alícuotas y almacenarlas congeladas.

Nota. Hay que evitar la congelación y descongelación repetidas.

Los controles liofilizados son estables durante mucho más tiempo que los líquidos y pueden ser adquiridos de fuentes comerciales.

Control de calidad

Ya que las hemoglobinopatías son trastornos heredados, algunos de los cuales conllevan considerables implicaciones clínicas y genéticas, es de vital importancia disponer de una documentación precisa y de un mantenimiento de los registros[19]. El uso de registros consecutivos a la hora de revisar los datos de un paciente es sumamente útil, puesto que, ya en sí mismo, constituye un aspecto de garantía de la calidad. Es posible que en algunas situaciones se necesite el muestreo repetido, los estudios familiares o ambos para aclarar la naturaleza de la anomalía en un individuo.

Hay que seguir minuciosamente los procedimientos de trabajos estándar internos, sobre todo en este campo de la hematología, donde una pequeña diferencia en la técnica puede representar una diferencia significativa en los resultados obtenidos y conducirnos a un error diagnóstico. Muchas de las técnicas descritas dirigen la atención a ciertos detalles técnicos específicos que son importantes para asegurar la validez de los resultados[23].

Es necesario utilizar estándares y materiales de control de referencia en cada uno de los análisis llevados a cabo y, en algunos casos, realizar análisis duplicados para demostrar la precisión. Hay estándares internacionales para la Hb F y la Hb A_2 (v. pág. 591), mientras que algunos países disponen de preparaciones de referencia nacional realizadas por instituciones de normalización nacional. Dichos estándares son extremadamente valiosos porque los valores diana se han establecido mediante estudios multicéntricos. Los materiales de control pueden prepararse internamente u obtenerse en el mercado. Las muestras almacenadas como sangre total a 4 °C pueden utilizarse de manera fiable durante varias semanas. Todos los laboratorios deben confirmar el intervalo de normalidad para sus métodos particulares y éste no debe diferir significativamente de los datos publicados.

Los laboratorios que realizan análisis de hemoglobina deben participar en un programa adecuado para probar su capacidad (v. pág. 566). En el Reino Unido, el National External Quality Assessment Scheme (NEQAS) proporciona muestras para las pruebas de la solubilidad falciforme; para la detección y cuantificación de las variantes de la hemoglobina y para la cuantificación de las Hb A_2, F y S.

Hay directrices nacionales e internacionales publicadas que cubren todos los aspectos de las investigaciones mencionadas aquí[11,20-25].

Electroforesis en acetato de celulosa a pH alcalino

La realización de la electroforesis de la hemoglobina, a pH 8,4-8,6, utilizando una membrana de acetato de celulosa es un método simple, fiable y rápido. En general, detecta satisfactoriamente la mayoría de las variantes de la hemoglobina clínicamente importantes[22,24,25].

Principio

A pH alcalino, la hemoglobina es una proteína cargada negativamente y cuando está sometida a una electroforesis migrará hacia el ánodo (+). Las variantes estructurales que presenten cambios en la carga superficial de la molécula a pH alcalino se separarán de la Hb A. Es posible que las variantes de la hemoglobina con una sustitución en un aminoácido situado en el interior de la molécula no se separen, como tampoco se separarán aquellas con una sustitución en un aminoácido sin efecto sobre la carga global.

Equipo

Tanque de electroforesis y fuente de alimentación. Cualquier tanque de electroforesis horizontal que permita un puente de 7 cm. Una fuente de energía con corriente continua capaz de suministrar 350 V a 50 mA es adecuada tanto para la electroforesis de acetato de celulosa como para la hecha sobre agar citrato.

Tiras de filtro o papel de cromatografía.

Papel secante.

Aplicadores. Se pueden obtener de la mayoría de los fabricantes de equipos de electroforesis; no obstante, también son válidos los microcapilares finos.

Membranas de acetato de celulosa. Se recomiendan las membranas con cubierta de plástico (7,6 × 6,0 cm) por su facilidad de uso y de almacenamiento.

Equipo de tinción.

Reactivos

Tampón de electroforesis. Tris/EDTA/borato (TEB) a pH 8,5. Tris-(hidroximetil)aminometano (Tris), 10,2 g; EDTA (sal disódica), 0,6 g; ácido bórico, 3,2 g; agua hasta 1 l. El tampón debe conservarse a 4 °C y puede utilizarse hasta 10 veces sin que se deteriore.

Agente humectante. Por ejemplo, la solución Zip-prep (Helena Laboratories): 1 gota de Zip-prep en 100 ml de agua.

Solución de fijación/tinción. Ponceau S, 5 g; ácido tricloroacético, 7,5 g; agua hasta 1 l.

Solución para desteñir. Ácido acético al 3% (v/v), 30 ml; agua hasta 1 l.

Reactivo hemolizante. Triton X-100 al 0,5% (v/v) en 100 mg/l de cianuro potásico.

Método

1. Centrifugar las muestras a 1.200 g durante 5 min. Diluir 20 µl del concentrado de hematíes en 150 µl del

reactivo hemolizante. Mezclar con suavidad y dejarlos durante al menos 5 min. Si se utilizan hemolizados purificados, diluir 40 µl de 10 g/dl de hemolizado con 150 µl de reactivo de lisis.

2. *Con la fuente de energía desconectada*, preparar el tanque de electroforesis colocando cantidades iguales del tampón TEB en cada uno de los compartimentos exteriores para el tampón. Humedecer dos tiras en el tampón y colocar una a lo largo de cada divisor/puente de soporte asegurando que hacen un buen contacto con el tampón.
3. Empapar el acetato de celulosa introduciéndolo lentamente en el reservorio del tampón. Dejar que el acetato de celulosa se empape durante al menos 5 min antes de su utilización.
4. Rellenar la placa de pocillos de muestra con 5 µl de cada muestra diluida o con control y cubrir con un cubreobjetos de 50 mm o con un porta de vidrio «corto» para evitar la evaporación. Cargar una segunda placa de pocillos de muestra con la solución Zip-prep.
5. Limpiar las puntas del aplicador inmediatamente antes de su uso con la solución Zip-prep y secarlas a continuación con papel secante.
6. Retirar la banda de acetato de celulosa del tampón y secarla dos veces entre dos capas de papel secante limpio. No dejar que el acetato de celulosa se seque.
7. Cargar el aplicador introduciendo las puntas en los pocillos de las muestras dos veces y depositar esta primera carga encima de un papel secante limpio. Volver a cargar el aplicador y depositar las muestras sobre el acetato de celulosa.
8. Colocar las placas de acetato de celulosa de un lado al otro de los puentes, con el lado plástico hacia arriba. Disponer dos portaobjetos de vidrio cruzando la banda para mantener un buen contacto. Realizar la electroforesis a 350 V durante 25 min.
9. Tras 25 min de electroforesis, transferir inmediatamente el acetato de celulosa al Ponceau S fijándolo y tiñéndolo durante 5 min.
10. Eliminar el exceso de tinción lavando durante 5 min en el primer reservorio de ácido acético y durante 10 min en cada uno de los dos restantes. Enjugar una vez más, utilizando un papel secante limpio y dejarlo secar.
11. Etiquetar las membranas y almacenarlas en un sobre de plástico protector.

Interpretación y comentarios

La figura 12.3 muestra las movilidades electroforéticas relativas de algunas variantes comunes de la hemoglobina a pH 8,5 en el acetato de celulosa. Se obtiene una separación satisfactoria de las Hb C, S, F, A y J (fig. 12.4). En general las Hb S, D y G migran muy juntas, igual que las Hb C, E y O^{Arab}. La diferenciación entre estas hemoglobinas puede hacerse utilizando geles de agarosa ácida, electroforesis en agar citrato, HPLC o IEF. Sin embargo, hay ligeras diferencias en la movilidad entre las Hb S, Lepore y D^{Punjab} así como entre las Hb C y E; la optimización de la técnica facilitará la detección de las diferencias. Generalmente, las

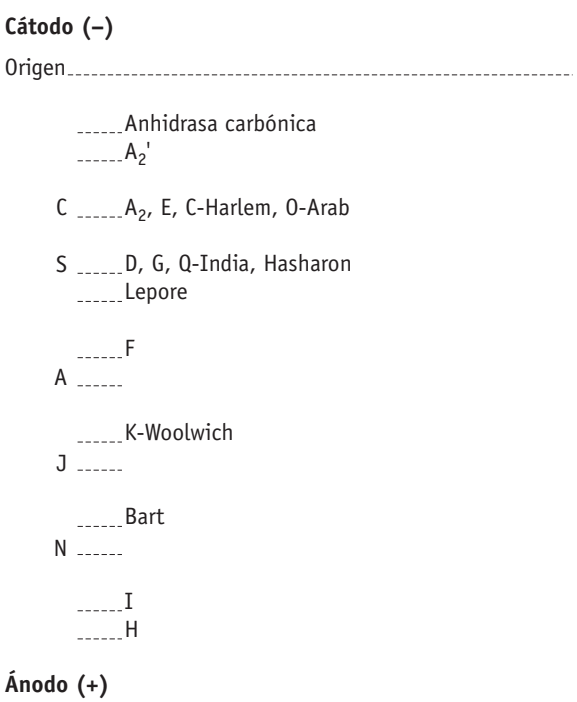


Figura 12.3. Representación esquemática de las movilidades relativas de algunas hemoglobinas anómalas. Acetato de celulosa a pH 8,5.

Hb Lepore y la D^{Punjab} migrarán ligeramente más hacia el ánodo que la Hb S (es decir, son algo más rápidas que la S); la Hb C migra un poco más hacia el cátodo que la Hb E (es decir, es algo más lenta que la E).

Todas las muestras que presentan una única banda en la posición S o en la C deben analizarse posteriormente utilizando electroforesis en gel de agarosa ácida o en agar citrato, HPLC o IEF para excluir la posibilidad de un heterocigoto compuesto como SD, SG, CE o CO^{Arab}.

La calidad de la separación obtenida con este procedimiento se ve afectada principalmente tanto por la cantidad de hemoglobina aplicada como por la siembra en el origen. Además, los retrasos entre la aplicación de la muestra y el comienzo de la electroforesis, el retraso en la tinción tras la electroforesis o el secado inadecuado del acetato previo a la aplicación producirán malos resultados. Esta técnica es suficientemente sensible para separar la Hb F de la Hb A y para detectar las variantes de la Hb A_2.

Si existe una hemoglobina anómala, la detección de una banda con la variante de la Hb A_2 junto con la fracción anómala representa la evidencia de que se trata de una variante de la cadena α. La electroforesis de la globina tanto a pH ácido como alcalino es también útil para dilucidar cuál es la cadena de globina afectada. Sin embargo, cada vez es menos necesaria debido a la mayor disponibilidad de la HPLC.

Cuando se encuentra una hemoglobina anómala, la medición del porcentaje de la variante puede tener importancia diagnóstica; esto se puede realizar mediante electroforesis con el procedimiento de elución para el cálculo de la

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

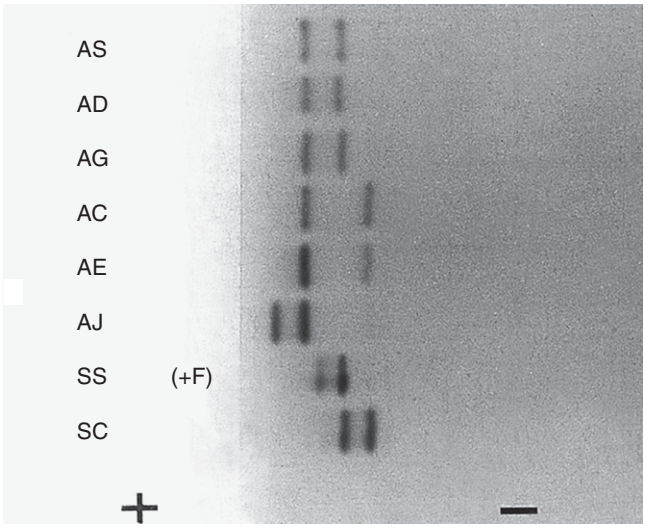


Figura 12.4. Movilidades relativas de algunas hemoglobinas anómalas. Acetato de celulosa a pH 8,5.

Hb A_2 que se da en la página 257. La cuantificación de la Hb S es a menudo clínicamente útil, tanto en pacientes con enfermedad de células falciformes, en tratamiento con transfusiones, como para el diagnóstico de trastornos en los que la Hb S se hereda junto con la talasemia α y β, como se indica en la tabla 12.5. La cuantificación de la Hb S puede hacerse con HPLC, electroforesis con elución o por cromatografía en microcolumnas.

Electroforesis en agar citrato a pH 6,0

Equipo[26,27]

Tanque de electroforesis y fuente de alimentación. Cualquier tanque de electroforesis horizontal que permita un puente de 7 cm. Una fuente de energía con corriente continua capaz de suministrar 350 V a 50 mA es adecuada tanto para la electroforesis de acetato de celulosa como para la de agar citrato.

Barras de enfriamiento (Helena Laboratories).

Bandejas de Perspex de 80 × 100 × 2 mm.

Tiras de esponja, papel de filtro o papel de cromatografía.

Aplicadores. Se pueden obtener de la mayoría de los fabricantes de equipos de electroforesis; no obstante, también son válidos los microcapilares finos.

Reactivos

Difco Bacto-agar.

Reactivo hemolizante. Triton X-100 al 0,5% (v/v) en 100 mg/l de cianuro potásico.

Tampón

Solución madre de tampón. Citrato trisódico dihidrato, 73,5 g; ácido cítrico 0,5 mol/l, 34,0 ml; agua hasta 1 l.

Tampón de trabajo. Diluir el tampón madre con agua en proporción 1:5. Preparar el día de su utilización.

Cianuro potásico 5 g/dl. Cianuro potásico, 0,5 g; agua destilada hasta 100 ml.

Colorante con dianisidina. Peróxido de hidrógeno al 3% (10 vol.), 1,0 ml; nitroprusiato sódico al 1% (nitroferrocianuro), 1,0 ml; ácido acético al 3%, 10,0 ml; o-dianisidina en metanol al 0,2%, 5,0 ml. Preparar la mezcla inmediatamente antes de su utilización.

Agente humectante. Por ejemplo, la solución Zip-prep (Helena Laboratories): 1 gota de Zip-prep en 100 ml de agua.

Ácido acético al 3%. 120 ml de ácido acético glacial con agua hasta 4 l.

Gel-Bond o un soporte similar.

Método

1. Centrifugar las muestras (a 1.200 g durante 5 min). Diluir 20 µl del concentrado de hematíes en 300 µl del reactivo hemolizante. Mezclar con suavidad y dejarlos durante al menos 5 min. Para las muestras de sangre del cordón umbilical, diluir 20 µl del concentrado de hematíes con 150 µl del reactivo lisante. Para los hemolizados purificados, diluir 20 µl de 10 g/dl de hemolizado con 150 µl de reactivo lisante.
2. *Con la fuente de energía desconectada*, colocar volúmenes iguales del tampón de trabajo en cada uno de los compartimentos exteriores para el tampón. Humedecer dos tiras de esponja en el tampón y situarlas una en cada compartimento contra el divisor/puente. Colocar dos barras refrigerantes congeladas en cada cámara central. Si no se dispone de barras refrigerantes o de paquetes de hielo, realizar la electroforesis a 4 °C.
3. Añadir 0,5 g de agar a 50 ml del tampón de trabajo. Calentar hasta aproximadamente 95 °C, agitando suavemente hasta que el agar se disuelva. Dejarlo enfriar hasta los 60 °C; añadir 0,5 ml de cianuro potásico, 5 g/dl. Pipetear aproximadamente 10 ml en cada una de las 4 bandejas Perspex (80 × 100 × 2 mm) y dejarlos reposar durante 15 min a temperatura ambiente hasta que se fijen. Estos geles pueden conservarse durante 1 semana a 4 °C en una bolsa de plástico sellada. Hay que dejar que los geles recuperen la temperatura ambiente antes de utilizarlos.
4. Rellenar la bandeja de pocillos de muestra con 5 µl de cada muestra y cubrirla con un cubreobjetos o un portaobjetos de vidrio de 6 cm. Llenar una segunda bandeja de pocillos de muestra con solución Zip-prep. Limpiar las puntas de los aplicadores introduciéndolas en la solución Zip-prep y ponerlas en un papel secante. Cargar el aplicador y depositar esta primera carga sobre un papel secante limpio. Recargar el aplicador y depositar las muestras en el gel de agar.
5. Colocar la bandeja del gel en una posición invertida en el tanque de electroforesis de forma que el gel se encuentre en contacto con las tiras de esponja y realizar la electroforesis a un voltaje constante de 50 V durante 60 min.
6. A los 60 min, desconectar la fuente de la electricidad, eliminar el gel y aplicar en capas sobre el agar la solución de tinción utilizando una pipeta Pasteur. Dejarlo teñir durante 10 min a temperatura ambiente.

Tabla 12.5. Resultados de las investigaciones de laboratorio en las interacciones de la Hb S y de la talasemia α y β en adultos

	MCV	% S	% A	% A_2	% F
AS	N	35–38	62–65	<3,5	<1
SS	N	88–93	0	<3,5	5–10
Talasemia S/β^o	B	88–93	0	>3,5	5–10
Talasemia S/β^+	B	50–93	3-30	>3,5	1–10
S/PHHF	N	65–80	0	<3,5	20–35
Talasemia AS/α^+	N/B	28–35	62–70	<3,5	<1
Talasemia AS/α^o	B	20–30	68–78	<3,5	<1
Talasemia SS/α	N/B	88–93	0	<3,5	1-10

B, bajo; N, normal; PHHF, persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal; VCM, volumen corpuscular medio.

7. Lavar tres veces en ácido acético al 3%, utilizando cada vez una solución nueva, mantener los geles a flote en la parte hidrófila de una pieza de Gel-Bond y dejarlos secar. Estos geles así montados se pueden conservar indefinidamente.

Interpretación y comentarios

La figura 12.5 muestra las movilidades electroforéticas relativas de algunas variantes comunes de la hemoglobina a pH 6,0 en agar citrato.

Electroforesis en gel de agarosa

Se dispone de geles de agarosa comerciales como sustitutos de los sistemas de separación, tanto ácidos como álcalis. Son sencillos de utilizar y particularmente útiles en laboratorios que procesan pequeñas cantidades de muestras.

Reactivos y método

Se debe seguir el método del fabricante.

Interpretación

Con los sistemas de agarosa ácida, el principio de la prueba es el mismo que el de la electroforesis en agar citrato a igual pH, pero existen diferencias significativas en la movilidad de algunas variantes de la hemoglobina. Con los sistemas álcalis, se obtienen, en general, los mismos patrones de separación, pero cuando se disponga de indicaciones individuales para la aplicación, se deben utilizar éstas como referencia. Ya que no todos los equipos las proporcionan, es posible que los laboratorios necesiten obtener sus propios datos sobre las variantes conocidas.

Cromatografía en fase líquida de alta resolución automatizada

La HPLC[28] por intercambio de cationes automatizada se está utilizando cada vez más como el método de diagnóstico inicial en los laboratorios de hemoglobinopatías con una elevada carga de trabajo[29]. Los costes, tanto del activo como de los fungibles, son más elevados que los de la electroforesis de hemoglobina, pero los costes de la mano de obra son menores; los costes globales pueden ser similares[30]. En comparación con la electroforesis de hemoglobina, la HPLC tiene cuatro ventajas:

1. Los analizadores están automatizados y por tanto utilizan menos tiempo del personal y permiten procesar grandes lotes.
2. Para el análisis se necesitan muestras muy pequeñas (5 µl); esto es especialmente útil en el área pediátrica.
3. En cada muestra se puede hacer la cuantificación de la hemoglobina normal y de las variantes.
4. Se puede realizar una identificación provisional de una proporción mucho mayor de variantes de la hemoglobina.

Principio

La HPLC depende del intercambio de los grupos cargados en el material de recambio iónico por los grupos cargados en la molécula de la hemoglobina. Un relleno de columna típico es un gel esférico de sílice de 5 µm. La superficie del soporte se modifica mediante grupos carboxilo para que tengan una carga catiónica débil, que permita la separación de las

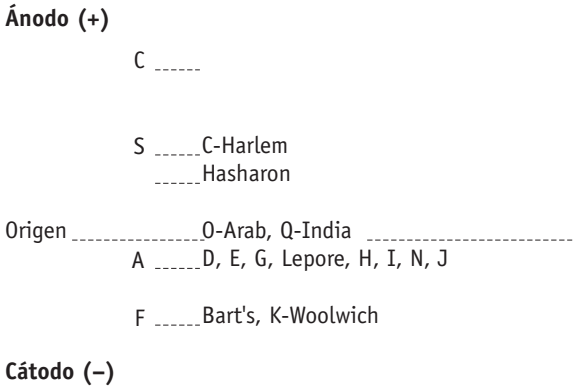


Figura 12.5. Representación esquemática de las movilidades relativas de algunas hemoglobinas anómalas. Agar citrato a pH 6,0.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

moléculas de hemoglobina con cargas diferentes mediante el intercambio de iones. Cuando se absorbe en la resina un hemolizado que contiene una mezcla de hemoglobinas, la tasa de elución de las distintas hemoglobinas viene determinada por el pH y por la fuerza iónica del tampón que se aplique a la columna. Con los sistemas automatizados actualmente en uso, la elución de las moléculas cargadas se consigue mediante un gradiente de sal que cambia continuamente; las fracciones se detectan a medida que pasan a través de un detector de luz visible/ultravioleta y se registran en un sistema informático integrado. El análisis del área bajo estos picos de absorción da el porcentaje detectado de la fracción. El tiempo de elución (tiempo de retención) de cualquier hemoglobina, normal o variante, que se halle presente se compara con el de las hemoglobinas conocidas, lo que proporciona la cuantificación tanto de las hemoglobinas normales (A, F y A_2) como de muchas variantes.

La figura 12.6 muestra una representación esquemática de un sistema de HPLC y la figura 12.7 muestra un cromatograma de diferentes hemoglobinas. Diversos fabricantes disponen de estos sistemas.

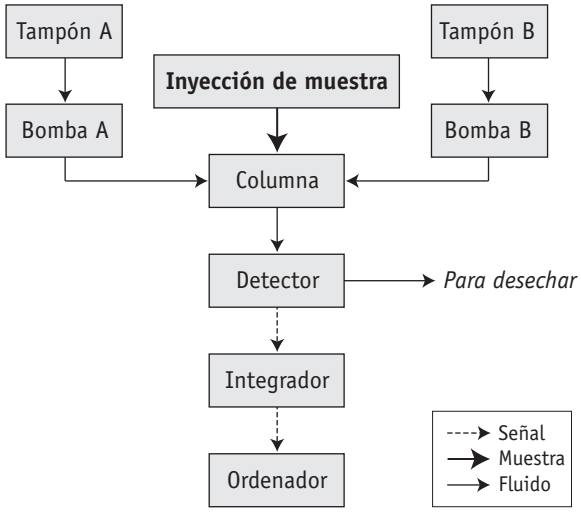


Figura 12.6. Representación en un diagrama de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) mostrando el flujo de la muestra y de los tampones.

Método

Se debe seguir el procedimiento del fabricante. Para prolongar la vida de la columna es importante seguir las instrucciones del fabricante en lo relativo a la concentración de hemoglobina de la muestra que se va a inyectar.

Interpretación y comentarios

Los resultados son exactos y reproducibles, pero, igual que con cualquier método de análisis de la hemoglobina, hay que realizar controles con cada lote. Si el sistema se utiliza para la detección de las variantes de la hemoglobina, se pueden comparar los tiempos de elución con los de los controles conocidos; sin embargo, los tiempos reales están influenciados por el lote del tampón y de la columna, el envejecimiento de la columna y la temperatura del laboratorio. Se puede hacer mejor la comparación utilizando el tiempo de elución relativo, que se calcula dividiendo el tiempo de elución de la variante por el de la fracción principal de la Hb A. Hay que indicar que la Hb A se separa en sus fracciones componentes, que son la A_0 y la A_1, y esta última fracción se subdivide frecuentemente en varios picos. Se requiere experiencia para la interpretación de los resultados porque varias hemoglobinas, tanto normales como anormales, pueden tener el mismo tiempo de retención y las variantes glucosiladas de la hemoglobina tendrán un tiempo de retención diferente de las formas no glucosiladas. La HPLC separa generalmente las Hb A, A_2, F, S, C, D^{Punjab} y $G^{Philadelphia}$ de las demás[29,31]. Sin embargo, tanto la Hb E como la Hb Lepore se obtendrán por elución conjunta con la hemoglobina A_2 (de la misma forma que otras hemoglobinas se obtendrán por elución conjunta con la Hb A, S y F). El tiempo de retención de los derivados glucosilados y de otros derivados de la Hb S puede ser el mismo que el de las Hb A_0 y A_2. Por ejemplo, los derivados de la hemoglobina S se obtendrán por elución conjunta con la hemoglobina A_2, por lo que los porcentajes de la A_2 con este método son inexactos y no tienen, por tanto, la misma importancia que el porcentaje de la hemoglobina A_2 medida por métodos alternativos[32]. Debido a estas razones, y dado que hay más de 750 variantes identificadas, la HPLC nunca podrá identificar definitivamente ninguna hemoglobina. Es importante analizar las variantes encontradas utilizando técnicas de segunda línea, como la prueba de la solubilidad de la hemoglobina, la electroforesis ácida y alcalina, o el isoelectroenfoque.

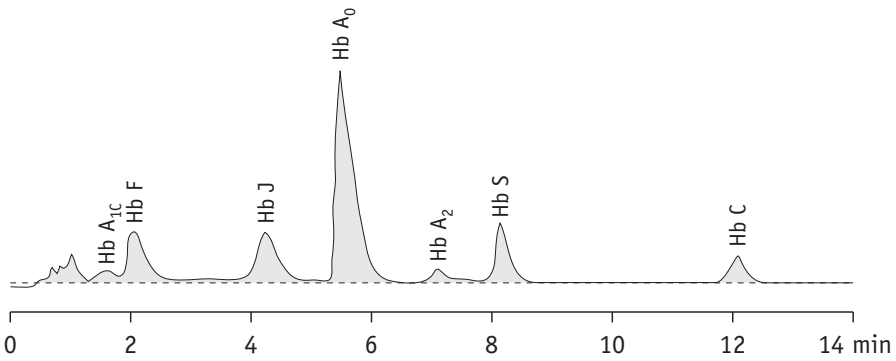


Figura 12.7. Mezcla de hemoglobinas separadas en un ejemplo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La HPLC puede también emplearse para la cuantificación de la Hb A_{1c} en el control de la diabetes mellitus; este procedimiento se realiza algunas veces en los laboratorios de hematología para hacer un uso óptimo del personal y del equipo. De hecho, se observa no pocas veces un aumento de la fracción glucosilada cuando se realiza la HPLC para la investigación de una sospecha de hemoglobinopatía[33]. A menos que se sepa que el paciente tiene una diabetes mellitus, hay que indicar esta anomalía al personal clínico.

Isoelectroenfoque

Principio

El isoelectroenfoque (IEF) utiliza una matriz que contiene anfolitos transportadores de bajo peso molecular y puntos isoeléctricos variables (pI). Estas moléculas migran a sus respectivos pI cuando se aplica una corriente, lo que da como resultado la formación de un gradiente de pH; para el análisis de la hemoglobina, se utiliza habitualmente un gradiente de pH de 6-8. Las moléculas de la hemoglobina migran a través del gel hasta que alcanzan el punto en el que sus pI individuales igualan al pH correspondiente en el gel. En este momento, la carga de la hemoglobina es neutra y la migración se detiene. El gradiente de pH contrarresta la difusión y la variante de la hemoglobina forma una banda estrecha discreta[34,35].

Método

Las placas preparadas de antemano, ya sean de gel de poliacrilamida o de agarosa, se pueden obtener de diversos fabricantes. Para la exactitud del método, se deben seguir las instrucciones del fabricante.

Interpretación y comentarios

El IEF hace un análisis satisfactorio de los hemolizados, de las muestras de sangre total o de las manchas de sangre seca. La utilización de manchas de sangre seca resulta adecuada cuando las muestras deban enviarse a grandes distancias o cuando sólo se puedan obtener unas cuantas gotas de sangre. Así como el IEF tiene la ventaja de que separa más variantes que el acetato de celulosa, tiene también la desventaja de que separa la hemoglobina en sus derivados postranslacionales. Por ejemplo, la Hb F se separa en la F_1 (F acetilada) y la F_{11}; la Hb A puede producir cinco bandas: A_0, A_1, A(αmet), A(βmet) y A(αβmet). Lo mismo ocurre con las demás hemoglobinas. Esto dificulta aún más la interpretación. Cuando se utiliza el IEF, la identificación de las variantes es sólo provisional y hay que utilizar métodos de segunda generación para un análisis posterior.

La figura 12.8 muestra los puntos isoeléctricos relativos de algunas variantes frecuentes de la hemoglobina y la figura 12.9 muestra la separación obtenida.

Electroforesis de la cadena de globina

Principio

La electroforesis de las cadenas de globina[36,37] se utiliza para establecer la cadena afectada (es decir, α, β o γ). Esta información es útil para predecir la naturaleza de la variante y las posibles interacciones.

Electroforesis alcalina de la cadena de globina, pH 8,0

Reactivos

Añadir 2 ml de ácido clorhídrico concentrado a 98 ml de acetona ácida enfriada a –20 °C. El reactivo debe prepararse inmediatamente antes de su utilización.

Tampón

Tampón madre. Ácido dietil barbitúrico, 36,8 g; solución de hidróxido sódico 1 mol/l, 120 ml. Disolver el ácido dietil barbitúrico en 1.500 ml de agua destilada hirviendo. Dejarlo enfriar hasta la temperatura ambiente y ajustar el pH a 8,0 con NaOH 1 mol/l. Preparar hasta obtener un volumen final de 2 l. Almacenar a temperatura ambiente.

Tampón de trabajo. Tampón madre, 600 ml; urea, 360 g; DL-ditiotreitol (DTT), 60 mg. Preparar el mismo día de su utilización.

Disolvente de la tinción. Ácido acético glacial, 400 ml; metanol, 1.800 ml; agua destilada, 1.800 ml.

Colorante negro amido. Disolvente de tinción, 1 l; negro amido (negro naftol), 0,4 g.

Éter dietílico.

Equipo

Tanque de electroforesis y fuente de alimentación. Cualquier tanque de electroforesis horizontal que permita un puente de 7 cm. Una fuente de energía con corriente continua capaz de suministrar 350 V a 50 mA es adecuada tanto para la electroforesis en acetato de celulosa como en agar citrato.

Tiras de filtro o papel de cromatografía.

Papel secante.

Aplicadores. Se pueden obtener de la mayoría de los fabricantes de equipos de electroforesis, aunque también pueden emplearse microcapilares finos.

Membranas de acetato de celulosa. Se recomiendan las membranas con cubierta de plástico (7,6 × 6,0 cm) por su facilidad de uso y de almacenamiento.

Equipo de tinción.

Tubos de vidrio para centrífuga.

Método

1. En una muestra de sangre total, lavar las células dos veces en NaCl, 9 g/l y lisarlas añadiendo un volumen igual de agua al concentrado de células lavadas. También son adecuados los hemolizados purificados.
2. Añadir 20 ml del hemolizado a 10 ml de acetona ácida fría en un tubo de vidrio de centrífuga, dispersando rápidamente la hemoglobina por medio de enjuagues con la pipeta.
3. Centrifugar a 700 g durante 10 min en una centrífuga refrigerada.
4. Utilizando una bomba de Venturi, desechar todo a excepción de una pequeña cantidad del sobrenadante

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

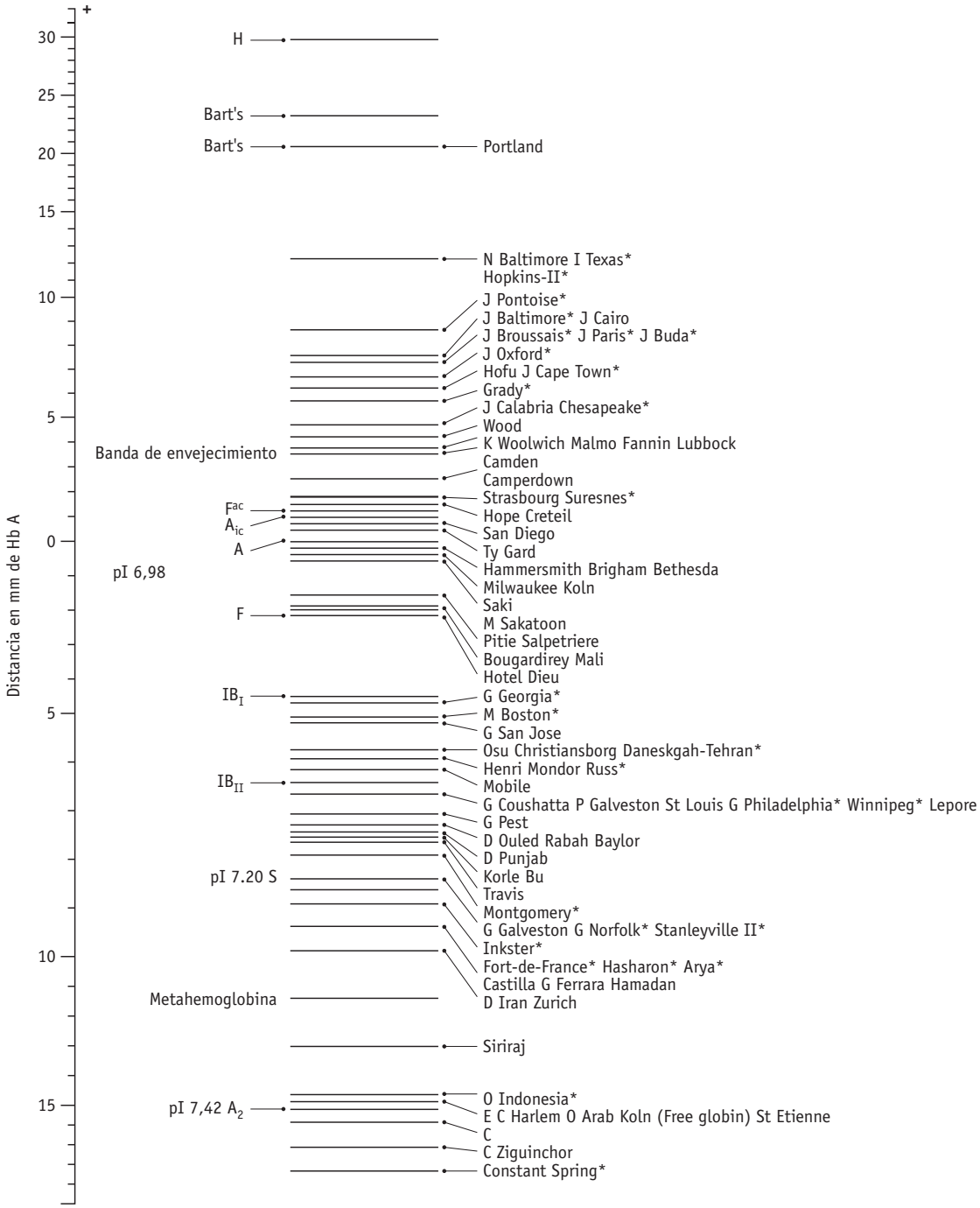


Figura 12.8. Representación esquemática de las movilidades relativas de algunas hemoglobinas anómalas. Isoelectroenfoque. Obsérvese la presencia de dos bandas para la hemoglobina Bart. La escala en mm no es lineal. *Indica las mutaciones de la cadena α. (Reproducido con permiso de Basset y cols.[33])

con acetona ácida. Evitar que la pipeta se contamine con el sedimento de la globina. Volver a suspender el sedimento de globina con la ayuda de un mezclador de vórtice.

5. Añadir enérgicamente 10 ml de acetona fría para dispersar completamente la globina.
6. Centrifugar a 700 g durante 5 min en una centrífuga refrigerada.
7. Repetir los pasos 4 a 6.
8. Eliminar la acetona y volver a suspender la globina. Añadir 10 ml de éter etílico y agitar enérgicamente para dispersar la globina.
9. Centrifugar a 700 g durante 5 min en una centrífuga refrigerada.
10. Secar la globina hasta obtener un sedimento de color crema aspirando el aire sobre la globina con una pipe-

ta Pasteur unida a una bomba de Venturi. La globina puede almacenarse a –20 °C hasta que vaya a analizarse. Disolver cada uno de los sedimentos de globina en 200 ml de tampón de trabajo antes de su utilización.

11. *Con la fuente de energía desconectada*, preparar el tanque de electroforesis colocando 100 ml del tampón de trabajo en cada uno de los compartimentos exteriores para el tampón. Humedecer dos tiras de papel y colocarlas a lo largo de cada uno de los divisores/puentes.
12. Introducir cuidadosamente la(s) placa(s) de acetato de celulosa en el reservorio del tampón de trabajo. Dejar que las placas se empapen durante al menos 1 h antes de su utilización.
13. Depositar 5 µl de las muestras de globina del paciente y de control en una bandeja de pocillos de muestra.
14. Retirar el acetato de celulosa del tampón de trabajo y secarlo entre dos capas de papel secante limpio hasta que esté casi seco.
15. Cargar el aplicador con la muestra y depositarla sobre un papel secante limpio; volver a cargar el aplicador y depositar la muestra sobre el acetato de celulosa en una posición central.
16. Colocar la placa de acetato de celulosa en el tanque de electroforesis con dos portaobjetos de microscopio cruzando cada placa para mantener el contacto con las tiras.
17. Realizar una electroforesis a 200 V durante 1 h.
18. Al finalizar la electroforesis, depositar la placa en la solución de tinción negro amido y dejarla que se fije y se tiña durante 10 min.
19. Desteñir las placas con el disolvente de tinción, dejándolo durante 5-10 min en cada reservorio hasta que el fondo se vuelva claro.
20. Retirar las placas del disolvente y dejar que se sequen entre dos hojas de papel secante limpias.

Interpretación y comentarios

Las cadenas α normales migran hacia el cátodo, mientras que las cadenas β normales lo hacen hacia el ánodo. La migración relativa de las globinas de las muestras de prueba se compara con los controles conocidos y con las movilidades de las muestras de prueba en la electroforesis en acetato de celulosa. Las movilidades relativas de algunas cadenas α y β anómalas se muestran en la figura 12.10.

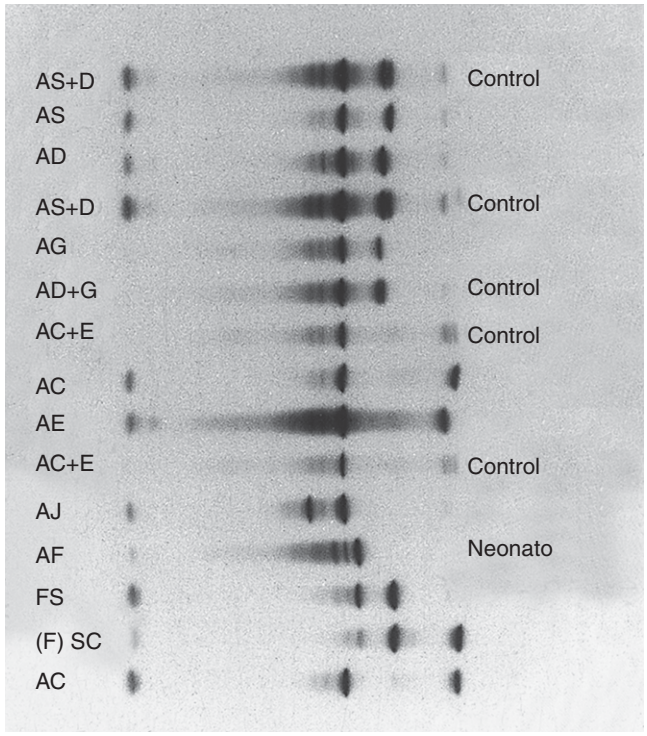


Figura 12.9. Movilidades relativas de algunas hemoglobinas anómalas. Isoelectroenfoque. Los controles son mezclas de distintas hemoglobinas.

Electroforesis ácida de la cadena de globina, pH 6,3

Reactivos

Solución lisante. EDTA tetrasódico de depósito al 40% p/v, 0,25 ml; cianuro potásico (KCN) de depósito 1,0 ml, 10 g/dl; agua hasta los 100 ml.

Ácido cítrico al 30%. Ácido cítrico, 30 g; completar hasta 100 ml con agua.

Tampones

Solución madre de tampón TEB, pH 8,5. Tris, 10,2 g; EDTA, 0,6 g; ácido bórico, 3,2 g.

Tampón de impregnación de TEB-urea, pH 6,3. Tampón TEB madre, 138 ml; agua destilada, 282 ml; urea, 216 g. Disolver la urea en el tampón TEB diluido, ajustar después el pH a 6,3 con ácido cítrico al 30%. Preparar el día de la utilización.

Tampón de trabajo de TEB-urea-mercaptoetanol, pH 6,3. Tampón TEB madre, 490 ml; urea, 250 g. Disolver la urea en el tampón TEB y ajustar después el pH a 6,3 con ácido cítrico al 30%. *Es fundamental que en el ajuste del pH se utilicen electrodos sensibles al TRIS.* Guardar 2 ml de este tampón para utilizarlo más tarde como diluyente de la muestra, después añadir 5,6 ml de 2-mercaptoetanol al resto del tampón, mientras se agita. Preparar el día de la utilización.

Ponceau S (0,5% en ácido tricloroacético al 7,5%). Ponceau S, 20 g; ácido tricloroacético, 300 ml; agua hasta 4 l. Almacenar a temperatura ambiente.

Ácido acético al 3%. Ácido acético glacial, 120 ml; agua hasta 4 l. Almacenar a temperatura ambiente.

NaCL, 9 g/l.

Equipo

Tanque de electroforesis y fuente de alimentación. Cualquier tanque de electroforesis horizontal que permita un puente de 7 cm. Una fuente de energía con corriente continua capaz de suministrar 350 V a 50 mA es adecuada tanto para la electroforesis en acetato de celulosa como en agar citrato.

Tiras de papel de filtro o papel de cromatografía.

Papel secante.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

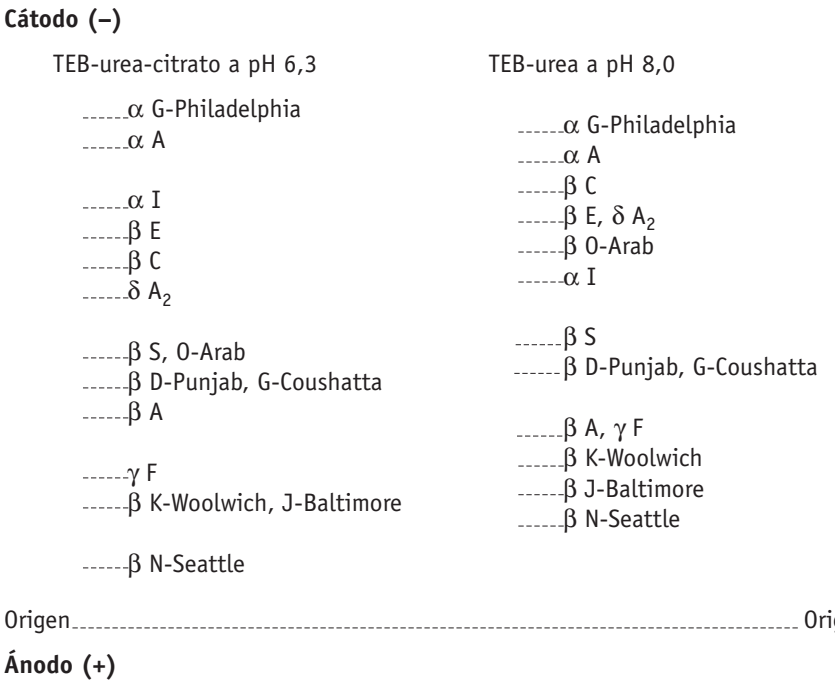


Figura 12.10. Representación esquemática de las movilidades relativas de algunas cadenas de globina.

Aplicadores. Se pueden obtener de la mayoría de los fabricantes de equipos de electroforesis; no obstante, también son válidos los microcapilares finos.

Membranas de acetato de celulosa. Se recomiendan las membranas con cubierta de plástico (7,6 × 6,0 cm) por su facilidad de uso y de almacenamiento.

Equipo de tinción.

Método

1. Lavar al menos 40 µl de concentrado de hematíes dos veces en NaCl, 9 g/l. Añadir 20 µl de concentrado de hematíes lavados a 60 µl de solución lisante, mezclar suavemente y dejarlo reposar durante 5 min. Transferir 20 µl de este lisado a un tubo que contenga 20 µl de tampón de trabajo TEB-urea fresco; añadir después 4 ml de 2-mercaptoetanol inmediatamente antes de su utilización. También se pueden utilizar hemolizados purificados.
2. *Con la fuente de energía desconectada*, preparar el tanque de electroforesis colocando 50 ml del tampón de trabajo de TEB-urea-mercaptoetanol en cada uno de los compartimentos exteriores para el tampón. Humedecer y colocar una tira de papel a lo largo de cada uno de los divisores/puentes.
3. Sumergir la(s) placa(s) con la membrana de acetato de celulosa en el tampón de impregnación de TEB-urea durante toda la noche.
4. Secar la(s) placa(s) por adsorción y transferirlas a 600 ml de tampón de trabajo TEB-urea-mercaptoetanol. Dejar que se impregnen entre 30 y 60 min.
5. Depositar 5 µl de las muestras de globina del paciente y de control en una bandeja de pocillos de muestra.
6. Retirar el acetato de celulosa del tampón de trabajo y secarlo entre dos capas de papel secante limpio hasta que esté casi seco.
7. Cargar el aplicador con la muestra y depositarla sobre un papel secante limpio; volver a cargar el aplicador y depositar las muestras sobre el acetato de celulosa en una posición central.
8. Colocar la placa de acetato de celulosa en el tanque de electroforesis con el acetato de celulosa en contacto con las tiras del ánodo y del cátodo. Colocar dos portaobjetos de microscopio sobre la parte trasera de la placa para mantener el contacto con las tiras.
9. Realizar una electroforesis a 150 V durante 2 h.
10. Preparar el equipo de tinción rellenando la primera cubeta con solución Ponceau S y tres cubetas más con ácido acético al 3%.
11. Al finalizar la electroforesis, depositar la placa en la solución de tinción Ponceau S y dejarla que se fije y se tiña durante 5 min.
12. Eliminar el exceso de colorante sumergiendo las placas en ácido acético al 3%, dejándolas durante 5-10 min en cada cubeta hasta que el fondo se vuelva claro. No agitar la placa en el ácido acético porque el acetato de celulosa se vuelve muy frágil y la cubierta trasera de plástico se despega fácilmente.
13. Retirar las placas del ácido acético y dejar que se sequen entre dos hojas de papel secante limpias.

Resultados

Las cadenas α normales migran hacia el cátodo, mientras que las cadenas β normales lo hacen hacia el ánodo. La migración relativa de las globinas de las muestras de prueba se compara con controles conocidos y con las movilidades de las muestras de prueba en la electroforesis en acetato de

celulosa. Las movilidades relativas de algunas cadenas α y β anómalas se muestran en la figura 12.10.

PRUEBAS PARA LA HB S

Las pruebas para detectar la presencia de Hb S se basan en la solubilidad reducida de esta hemoglobina en condiciones de baja tensión de oxígeno.

Falciformación en sangre total

El fenómeno de la falciformación puede demostrarse en una extensión sanguínea fina y fresca (sellada con una mezcla de vaselina/parafina o con barniz de uñas). Si hay Hb S, los hematíes pierden su forma redondeada suave y se vuelven falciformes. Este proceso puede tardar hasta 12 h en el rasgo de la Hb S, mientras que los cambios son evidentes en los homocigotos y en los heterocigotos compuestos después de 1 h a 37 °C. Estos cambios pueden acelerarse con la adición de un agente reductor como el ditionito sódico de la siguiente forma:

Reactivos

Fosfato hidrógeno disódico (Na_2HPO_4). 0,114 mol/l (16,2 g/l).

Ditionito sódico ($Na_2S_2O_4$). 0,114 mol/l (19,85 g/l). Preparar cada vez antes de cada utilización.

Tampón de trabajo. Mezclar 3 volúmenes de Na_2HPO_4 con 2 volúmenes de $Na_2S_2O_4$ para obtener un pH de 6,8 en la solución resultante. Utilizar inmediatamente

Método

Añadir 5 gotas del reactivo recién preparado a 1 gota de sangre anticoagulada en un portaobjetos. Sellar entre el portaobjetos y el cubreobjetos de vidrio con una mezcla de vaselina/parafina o con barniz de uñas. La falciformación se produce casi inmediatamente en la anemia de células falciformes y debería ser obvia en el rasgo de células falciformes antes de 1 h (fig. 12.11). Al mismo tiempo se debe realizar una prueba sobre un control positivo de Hb A más Hb S.

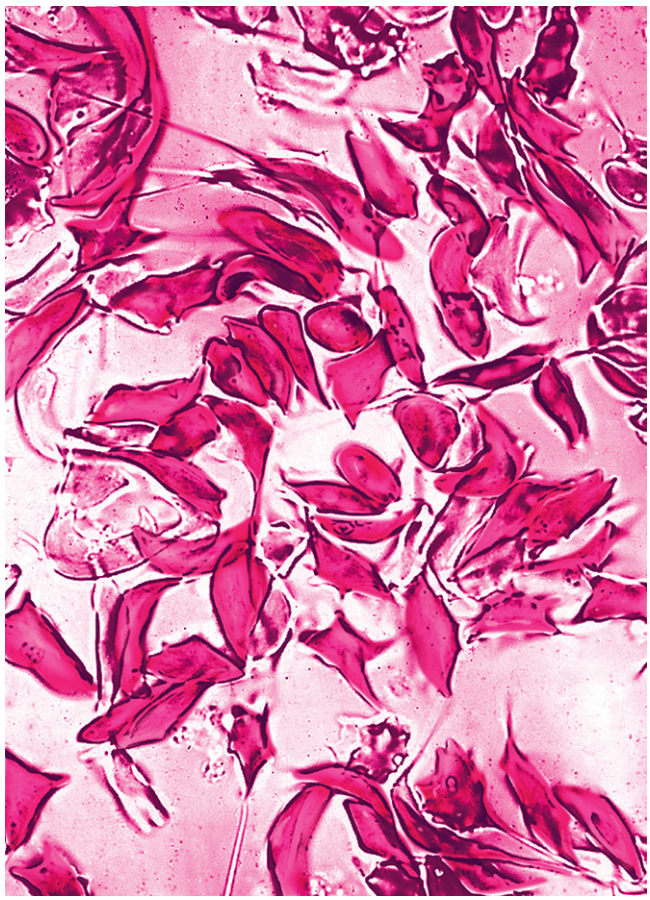


Figura 12.11. Microfotografía de hematíes falciformes. Anemia de células falciformes. Preparación sellada de sangre. Predominio de las formas filamentosas con falciformación completa.

Prueba de la solubilidad de la Hb S

Principio

La hemoglobina de células falciformes es insoluble en estado desoxigenado en un tampón fosfato de alta molaridad. Los cristales que se forman refractan la luz y causan turbidez en la solución[38].

Reactivos

Tampón fosfato. Fosfato dipotásico de hidrógeno anhidro, 215 g; fosfato potásico de dihidrógeno anhidro, 169 g; ditionito sódico, 5 g; saponina, 1 g; agua hasta 1 l.

Nota. Disolver el K_2HPO_4 en agua antes de añadir el KH_2PO_4, añadir después el ditionito y finalmente la saponina. Esta solución es estable durante 7 días. Debe conservarse en la nevera.

Método

1. Pipetear 2 ml del reactivo en tres tubos de ensayo de 12 × 75 mm.
2. Dejar que el reactivo alcance la temperatura ambiente.
3. Añadir 10 µl de concentrado de hematíes (a partir de sangre anticoagulada con EDTA) a uno de los tubos, 10 µl de concentrado de hematíes de un sujeto con rasgo de células falciformes conocido como control positivo al segundo tubo y 10 µl de concentrado de hematíes de un sujeto normal como control negativo al tubo restante.
4. Mezclar bien y dejarlos reposar durante 5 min.
   Nota. La mezcla de reactivo con sangre debe ser de color rosa o rojo suave. Un color naranja suave indica que el reactivo se ha deteriorado.
5. Sostener el tubo 2,5 cm por delante de una tarjeta blanca con líneas negras estrechas y comparar la turbidez con las muestras de control positiva y negativa.
6. Si la muestra parece positiva, centrifugar a 1.200 g durante 5 min. La prueba positiva mostrará una banda rojo oscuro en la parte superior mientras que la solución será rosada o incolora por debajo.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Interpretación y comentarios

Una prueba de falciformación o de solubilidad positiva indica la presencia de Hb S y, como tal, es útil en el diagnóstico diferencial de las Hb D y G, que migran con la Hb S en la electroforesis sobre acetato de celulosa a pH alcalino. Los resultados positivos se observan también en las muestras de hemoglobinas, raras, que contienen tanto una mutación de la Hb S como una mutación adicional en la cadena β. Una prueba de solubilidad positiva indica meramente la presencia de una hemoglobina falciforme y no diferencia entre homocigotos, heterocigotos compuestos o heterocigotos. En caso de urgencia, puede ser necesario decidir si un individuo padece una enfermedad de células falciformes antes de disponer de los resultados de la electroforesis de la hemoglobina. En estas circunstancias, si la prueba de la solubilidad es positiva, se puede hacer un diagnóstico provisional de rasgo de células falciformes si la morfología de los hematíes es normal en la extensión sanguínea. Si la extensión sanguínea muestra células falciformes o en diana, se puede hacer un diagnóstico provisional de enfermedad de células falciformes, independientemente de la hemoglobina; muchos pacientes con heterocigosidad compuesta células falciformes/Hb C presentarán una Hb normal. Hay que recordar la posibilidad de que la prueba de la falciformación sea negativa en lactantes con enfermedad de células falciformes.

Se han notificado *resultados falsos positivos* en la leucocitosis grave; en la hiperproteinemia (como el mieloma múltiple) y en presencia de una hemoglobina inestable, sobre todo después de la esplenectomía. La utilización de concentrados de hematíes, como se describe en este método, minimiza el problema de los resultados falsos positivos producidos por la hiperproteinemia y por la hiperlipidemia.

Los *resultados falsos negativos* pueden producirse en pacientes con una Hb baja y la utilización de concentrado de hematíes puede subsanar este problema. Los resultados falsos negativos pueden también ocurrir si se utilizan reactivos antiguos o pasados de fecha y si la mezcla ditionito/tampón no es acabada de preparar. Es probable que los resultados falsos negativos se den en lactantes menores de 6 meses de edad y en otras situaciones (p. ej., en la postransfusión) en que el valor de la Hb S es inferior al 20%.

Todas las pruebas de falciformación, sean positivas o negativas, deben confirmarse por electroforesis o por HPLC tan pronto como sea posible.

DETECCIÓN NEONATAL

Se debe hacer una prueba de una muestra de sangre del cordón umbilical o del talón de todos los niños con riesgo de presentar enfermedad de células falciformes o talasemia β mayor (es decir, cuando la madre tenga un gen de la Hb S, C, D^{Punjab}, E, O^{Arab} o Lepore, o un rasgo talasémico α o δβ). Si se utiliza un espécimen de la sangre del cordón umbilical, es importante que la vena umbilical se limpie antes de la obtención de la muestra para evitar contaminación con la sangre materna, ya que incluso pequeñas cantidades de sangre materna pueden producir un cuadro de enfermedad de células falciformes que sea mal diagnosticado como rasgo de células falciformes.

En las áreas donde la frecuencia de hemoglobinopatías es elevada, siempre que sea posible debe hacerse una detección neonatal universal. En Inglaterra, la detección universal está actualmente establecida para cubrir la totalidad del país[39]. El programa de detección está unido al programa existente para la detección de la fenilcetonuria y del hipotiroidismo congénito mediante la prueba de la mancha de sangre seca. Se utiliza la misma muestra de mancha de sangre seca para la enfermedad de células falciformes y para la talasemia mayor.

Las muestras de la mancha de sangre seca se analizan utilizando HPLC; el IEF-HPLC es generalmente la prueba de primera línea y las anomalías se confirman por IEF. La electroforesis de hemoglobina no se recomienda para el análisis de las manchas de sangre seca. El análisis de las muestras de sangre del cordón umbilical se realiza más bajo petición clínica que para la detección general. Si se utilizan muestras de sangre del cordón umbilical, pueden examinarse mediante la electroforesis de la hemoglobina usando el acetato de celulosa a pH alcalino, el agar citrato a pH ácido[22], la HPLC o el IEF. Si se detecta cualquier anomalía, se debe realizar una técnica de confirmación.

Se debe repetir la prueba a los niños diagnosticados provisionalmente como portadores de Hb SS, SC, SD^{Punjab}, SO^{Arab}, o talasemia Sβ, antes de las 6-8 semanas del nacimiento. Tras la confirmación del diagnóstico, hay que hacerles el seguimiento en una clínica pediátrica, comenzar inmediatamente el tratamiento profiláctico con penicilina para evitar las infecciones neumocócicas y tratarlos de forma adecuada a largo plazo[3]. Los niños con talasemia β mayor se detectarán también mediante el protocolo de detección de rutina; la Hb A puede estar ausente o enormemente reducida en el momento del nacimiento y en el momento de repetir la prueba a los niños. El diagnóstico de rasgo talasémico β no puede ser realizado de manera fiable hasta los 12 meses de edad a menos que se utilicen técnicas de ADN (v. pág. 482).

DETECCIÓN DE UNA HEMOGLOBINA INESTABLE

Las variantes de la hemoglobina presentan una amplia gama de inestabilidad, pero las hemoglobinas clínicamente inestables pueden detectarse tanto mediante la prueba de estabilidad al calor como con la del isopropanol[40]. No obstante, los grados menores de inestabilidad con poca o ninguna importancia clínica pueden necesitar otras técnicas. Las hemoglobinas inestables son frecuentemente silentes utilizando técnicas electroforéticas o cromatográficas, y las pruebas para la inestabilidad de la hemoglobina son esenciales para la detección o la exclusión de una hemoglobina inestable.

Disponemos de diversos métodos para la demostración de la inestabilidad de la hemoglobina. Las muestras analizadas deben ser tan frescas como sea posible y en cualquier

caso tener menos de 1 semana. Los controles deben tener el mismo tiempo que la muestra que se va a estudiar; se puede utilizar una muestra de sangre normal del cordón umbilical como control positivo. La prueba del isopropanol utiliza controles preparados químicamente.

Prueba de la estabilidad al calor

Principio

Cuando se calienta la hemoglobina en solución, los puentes hidrofóbicos de Van der Waals se debilitan y la estabilidad de la molécula se reduce[41,42]. En condiciones controladas, las hemoglobinas inestables precipitan mientras que las hemoglobinas estables permanecen en la solución.

Reactivo

Tampón Tris-HCl, 0,05M a pH 7,4. Tris, 6,05 g; agua hasta 1 l. Ajustar el pH a 7,4 con HCl concentrado. Véase la nota en la página 249 relativa a los electrodos sensibles al Tris.

Método

1. Añadir 0,2 ml de lisado, recién preparado mediante el método del hemolizado purificado descrito en la página 241, a un tubo que contenga 1,8 ml de tampón. El control negativo se obtiene de una muestra normal fresca.
2. Colocar los tubos en un baño María a 50 °C. Examinar los tubos a los 60, 90 y 120 min para ver si hay precipitación.

Interpretación y comentarios

Una hemoglobina con inestabilidad importante sufrirá una precipitación marcada a los 60 min y una floculación profusa a los 120 min. El control normal puede mostrar alguna precipitación (fina) a los 60 min, pero debe ser mínima.

Prueba de la estabilidad al isopropanol

Principio

Cuando se disuelve la hemoglobina en un disolvente como el isopropanol, que es menos polar que el agua, los puentes hidrofóbicos de Van der Waals se debilitan y la estabilidad de la molécula se reduce. En condiciones controladas, las hemoglobinas inestables precipitan mientras que las hemoglobinas estables permanecen en la solución. Este método tiene la ventaja de que no requiere un baño María a 37 °C y que se pueden hacer controles positivos modificando el tampón[43].

Reactivos

Tampón Tris-HCl, 0,1 mol/l a pH 7,4. Tris, 12,11 g; agua hasta 1 l. Ajustar el pH a 7,4 con HCl concentrado. Véase la nota en la página 252 relativa a los electrodos sensibles al Tris.

Tampón isopropanol, 17%. Mezclar 17 volúmenes de isopropanol con tampón tris-HCl para preparar hasta 100 volúmenes. La solución del tampón de isopropanol al 17% puede almacenarse en una botella de vidrio herméticamente cerrada durante 3 meses a 4 °C.

Controles positivos. Son tampones producidos mediante la adición de pequeñas cantidades de cinc al tampón estándar de isopropanol al 17%. Para obtener el control con la mayor positividad posible (5+), añadir 0,6 mmol/l de acetato de cinc, y para el control con la menor positividad (1+), añadir 0,1 mmol/l de acetato de cinc al tampón. Las muestras que contienen Hb E o Hb F pueden utilizarse también como controles positivos débiles.

Método

1. Preparar los hemolizados de oxihemoglobina a partir de las muestras problema y controles normales como se describe en la página 243.
2. Pipetear 2,0 ml del tampón estándar de isopropanol en dos tubos; a continuación introducir 2,0 ml de las soluciones de control 1+ y 5+, respectivamente, en otros dos tubos.
3. Añadir 0,2 ml de la muestra problema al primer tubo. Añadir 0,2 ml de la muestra control normal en los tres tubos restantes.
4. Colocar los tubos en un baño María a 37 °C durante 30 min. Examinar los tubos a los 5, 20 y 30 min para ver si hay turbidez y floculación fina.

Interpretación y comentarios

Una muestra normal permanecerá clara hasta los 30 min, momento en el que puede aparecer una ligera turbidez. Algunas hemoglobinas inestables mostrarán una precipitación claramente observable incluso a los 5 min de incubación, mientras que las variantes más estables no mostrarán la precipitación hasta transcurridos 20 min.

Se pueden obtener resultados positivos con muestras que contengan solamente un 10% de la Hb F o con muestras que contengan mayores cantidades de metahemoglobina como resultado de un almacenamiento prolongado. Si la muestra normal presenta una precipitación prematura, comprobar la temperatura del baño María porque es probable que sea superior a los 37 °C.

Hay que evitar los resultados falsos negativos manteniendo la incubación hasta que el control normal precipite.

DETECCIÓN DE LA HB M

La metahemoglobina (Hi) contiene hierro en su forma férrica. Las variantes heredadas de la hemoglobina que se oxidan a metahemoglobina más rápidamente que la Hb A se denominan Hb M. Ésta es una de las causas de un trastorno muy raro: la metahemoglobinemia congénita. La otra causa de metahemoglobinemia heredada es el déficit en metahemoglobina reductasa (v. pág. 174). Los valores de metahemoglobina varían pero pueden alcanzar hasta el 40% de la hemoglobina total. La metahemoglobinemia *per se* puede también producirse por oxidantes químicos.

Las variantes de la metahemoglobina pueden detectarse por electroforesis de la hemoglobina a pH 7, pero casi todas pueden distinguirse de la metahemoglobina A (Hi A) por sus espectros de absorción. Cada metahemoglobina tiene su propio y distinto espectro de absorción. La Hi A tie-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

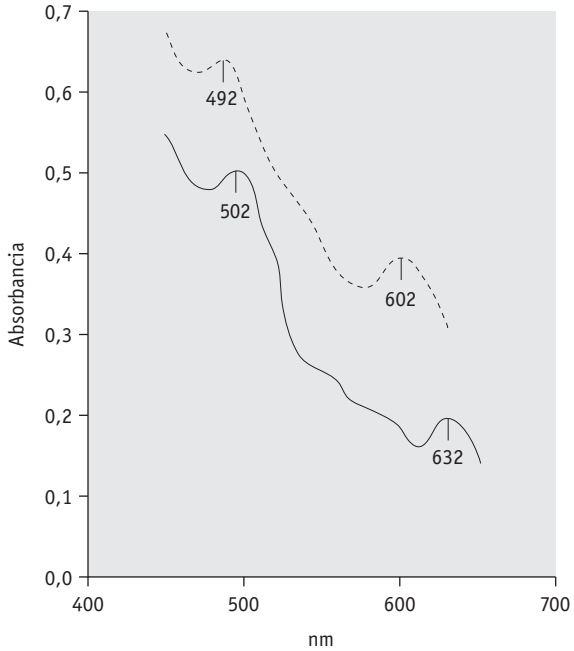


Figura 12.12. Máxima absorción de las metahemoglobinas en el intervalo de 450–650 nm. La metahemoglobina normal está representada por una línea continua; la Hb M Saskatoon por una línea punteada. (Reproducido con permiso de Lehmann H, Huntsman KG 1974 Man's haemoglobins, 2nd ed. p. 214. North-Holland, Ámsterdam.)

ne dos picos de absorción a 502 y a 632 nm, mientras que los picos de absorción para la variante Hb M se presentan a diferentes longitudes de onda (fig. 12.12).

Reactivo

Ferrocianuro potásico. 0,1 mol/l.

Método

1. Lisar con agua los hematíes lavados de una muestra sanguínea de una Hb A conocida y los de la muestra problema hasta conseguir una concentración de hemoglobina de alrededor de 1 g/l.
2. Convertir la hemoglobina en Hi añadiendo 5 µl de solución de ferrocianuro potásico por cada mililitro de hemolizado.
3. Dejar reposar durante 10 min a temperatura ambiente.
4. Registrar el espectro de la Hi A utilizando un espectrómetro de detección automático.
5. Comparar con el espectro de la Hi en la muestra que se va a estudiar.

DETECCIÓN DE HEMOGLOBINAS CON AFINIDAD ALTERADA

Las técnicas electroforéticas y cromatográficas fracasan frecuentemente a la hora de separar estas hemoglobinas anómalas y no son fiables para la detección porque la sustitución de los aminoácidos no implica, a menudo, un cambio en la carga.

La investigación que aporta mayor información es la medición de la curva de disociación del oxígeno (v. pág. 199). El hallazgo más significativo es la reducción de la constante de Hill (valor «n») porque sólo puede producirse por un cambio en la estructura de la hemoglobina. El p_{50} puede estar aumentado (hemoglobina de baja afinidad) o reducido (hemoglobina de alta afinidad). Las hemoglobinas de alta afinidad producen un aumento del valor de la Hb, mientras que las hemoglobinas de baja afinidad producen una reducción del valor de la Hb. El p_{50} aislado puede estar afectado por otros factores como la concentración elevada de 2,3-DPG en el déficit de la piruvatocinasa. Estos aspectos se analizan en el capítulo 10.

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LAS VARIANTES MÁS FRECUENTES DE HEMOGLOBINA

En la tabla 12.6 se sugieren distintos métodos para el diagnóstico diferencial y la figura 12.13 proporciona una comparación entre algunas variantes más frecuentes utilizando diversas técnicas.

INVESTIGACIÓN DE LA SOSPECHA DE TALASEMIA

En la figura 12.14 se muestra el esquema sugerido para el estudio; a continuación se enumeran los métodos utilizados.

Hallazgo inicial en la electroforesis en acetato de celulosa	Variante más probable	Diferenciación
Banda en la posición de la Hb S	Hb S, D, G-Philadelphia, Lepore	Hemograma completo, cuantificación, prueba de la solubilidad, electroforesis en agar citrato/gel ácido, IEF, HPLC
Banda en la posición de la Hb C	Hb C, E, O-Arab	Cuantificación, electroforesis en agar citrato/gel ácido, IEF, HPLC
Banda muy rápida	Hb I, H	Cuerpos H

HPLC, cromatografía en fase líquida de alta resolución; IEF, isoelectroenfoque.

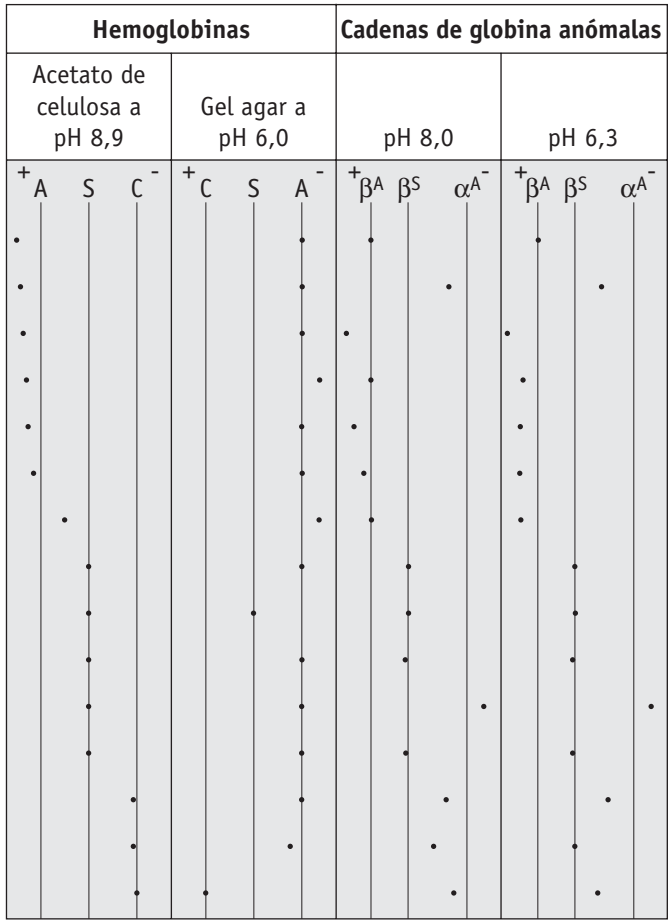


Figura 12.13. Comparación entre las movilidades relativas de algunas hemoglobinas anómalas por distintos métodos. La posición de las Hb A, S y C y sus cadenas correspondientes está indicada por las líneas verticales. (Adaptado de ICSH[22].)

1. Los resultados de Hb A_2 comprendidos entre 3,3 y 3,8% necesitan una evaluación cuidadosa y deben repetirse utilizando un segundo método.
2. Los valores de la Hb A_2 en el rasgo talasémico α son por lo general inferiores al 25%. Algunos tipos de rasgo talasémico β tienen valores de la Hb A_2 normales.

Métodos para la investigación de la talasemia

1. Hemograma en sangre total con índices eritrocitarios y extensión sanguínea y, en casos seleccionados, recuento de reticulocitos.
2. Medición de la Hb A_2 mediante electroforesis en acetato de celulosa con elución.
3. Medición de la Hb A_2 mediante cromatografía de microcolumnas (v. pág. 257).
4. HPLC automatizada (v. pág. 259).
5. Cuantificación de la Hb F (v. pág. 259 o HPLC).
6. Evaluación de la distribución de Hb F (v. pág. 261).
7. Evaluación del estado del hierro (v. pág. 263).
8. Demostración de los cuerpos de inclusión eritrocitarios (v. pág. 263).
9. Análisis del ADN (v. pág. 264).

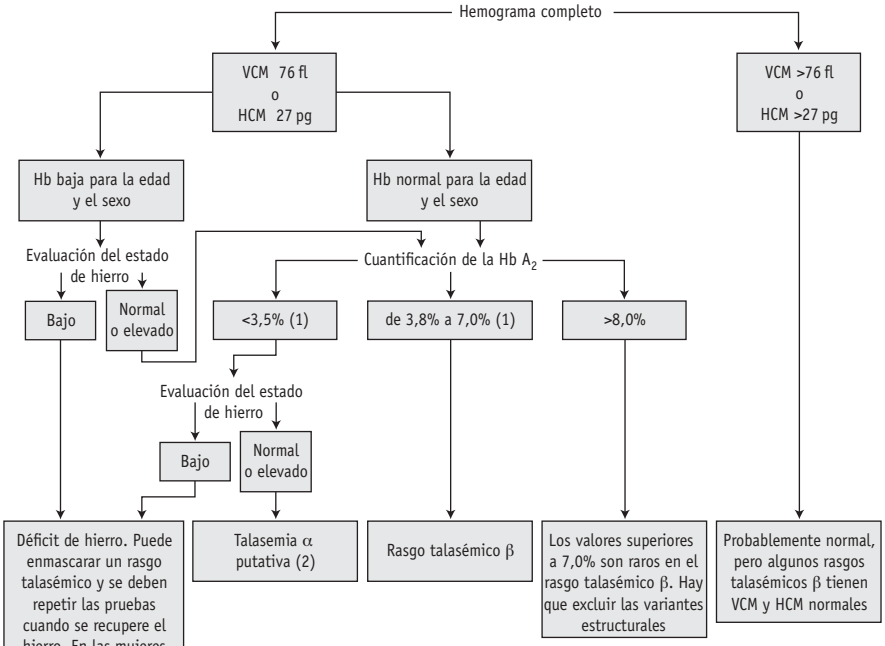
Recuento y extensión sanguínea

El hemograma, incluyendo Hb e índices eritrocitarios, proporciona una información valiosa y útil para el diagnóstico de las talasemias α y β. En los casos clásicos se observará una elevación del recuento de hematíes, acompañada de una reducción del VCM y de la HCM. La CHCM y la amplitud de la distribución eritrocítica (ADE) son, a menudo, normales en el rasgo talasémico, mientras que es más probable que estén aumentadas en la anemia ferropénica. La extensión sanguínea puede mostrar características como células en diana, punteado basófilo y microcitosis en ausencia de hipocromía, que apuntan hacia un diagnóstico de rasgo talasémico. La anisocromía, que es una característica del déficit de hierro, no es habitual en el rasgo talasémico α o β, aunque puede verse en la enfermedad de la hemoglobina H. La enfermedad de la hemoglobina H se caracteriza también por una poiquilocitosis marcada. El recuento de reticulocitos está aumentado en la enfermedad de la hemoglobina H.

CUANTIFICACIÓN DE LA HB A_2

Un valor aumentado de la Hb A_2 es característico de la talasemia β heterocigota y para el diagnóstico o la exclusión

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.



(1) Los valores entre 3,53 y 8% necesitan una evaluación cuidadosa y deben repetirse utilizando un segundo método.
(2) Los valores de la A_2 en la talasemia α son generalmente inferiores a 2,5%, algunos tipos de rasgo talasémico β tienen valores normales de la Hb A_2.

Figura 12.14. Esquema sugerido para la investigación de una talasemia.

del rasgo talasémico β se necesita su medición precisa. La cuantificación puede realizarse por elución tras una electroforesis en acetato de celulosa o por cromatografía, ya sea de microcolumna o con una HPLC.

Medición de la Hb A2 por elución del acetato de celulosa

Principio

El hemolizado se separa en las fracciones que lo componen mediante electroforesis alcalina en membrana de acetato de celulosa. Las proporciones relativas de cada fracción separada se cuantifican por espectrometría de los eluidos de dichas fracciones[44,45].

Equipo

Tanque de electroforesis y fuente de alimentación. Véase la página 244.
Tiras de papel de filtro o papel de cromatografía.
Membranas de acetato de celulosa (78 × 150 mm).

Reactivo

Solución madre de tampón TEB, pH 8,5. Tris (hidroximetil) metilamina, 40,8 g; EDTA disódico, 2,4 g; ácido ortobórico, 12,8 g; agua hasta 4 l.

Método

1. Preparar un hemolizado purificado a partir de hematíes lavados (v. pág. 243). El hemolizado puede conservarse a 4 °C hasta 1 semana antes del análisis.
2. *Con la fuente de energía desconectada*, depositar volúmenes iguales del tampón TEB en las cámaras del ánodo y del cátodo. Cortar unos trozos de papel de filtro o de papel cromatográfico, empaparlos en la cámara del tampón y colocarlos a lo largo de los soportes del puente como tiras. Fijar la amplitud del puente en 7 cm.
3. Empapar el acetato de celulosa haciendo flotar cuidadosamente la hoja sobre la superficie del tampón; asegurarse de que no haya burbujas de aire atrapadas bajo la superficie. Cuando la hoja haya absorbido el tampón, sumergirla. Dejarla durante al menos 5 min, retirarla y secarla cuidadosamente entre dos hojas de papel secante.
4. Colocar el acetato de celulosa a través de los soportes del puente de forma que el extremo alargado de la hoja esté en la zona del ánodo. Utilizando una regla como guía, aplicar 30 µl de lisado a cada hoja en una única línea que esté a 1 cm del cátodo. Dejar 1 cm de margen en cada extremo de la línea de aplicación.
5. Aplicar un voltaje constante de 250 V hasta que la separación sea completa. Esto llevará aproximadamente 60 min y debería haber al menos 1 cm de separación entre las bandas A y A_2 al final de la operación. Comprobar la separación a los 40 min, confirmando que la Hb A (o variantes como la Hb H, Hb J o Hb N) no se desplaza por las tiras de papel. Comprobar de nuevo y sucesivamente a los 5-10 min. Las muestras con una banda variante entre las bandas A y A_2 necesitarán hasta 30 min más para obtener una separación satisfactoria.
6. Retirar la hoja sujetándola cuidadosamente por la mecha de contacto en el ánodo; no colocarla en la superficie de trabajo. Cortar y desechar el acetato de celulosa que haya estado en contacto con la tira del cátodo. Cortar una tira «blanca» de aproximadamente 2 cm de ancho a partir del extremo del cátodo de una de las ho-

jas (no utilizar el acetato de celulosa que tiene la línea de aplicación). Desprender la sección de la Hb A_2, cortando la banda en piezas de aproximadamente 1 cm^2 directamente en un contenedor universal limpio. Cortar cualquier banda de variante de la misma forma y, por último, cortar la banda de la Hb A.

7. Añadir 4 ml de agua destilada tanto a los contenedores con el blanco como con la Hb A_2 y 16 ml de agua al contenedor con la Hb A. Las bandas de las variantes se eluyen habitualmente en 8 ml de agua, aunque puede haber variaciones.
8. Mezclar los eluidos durante 20 min y mezclarlos de nuevo por inversión inmediatamente antes de medir la absorbancia.
9. Leer la absorbancia del blanco contra agua a 415 nm. Esta lectura debe ser inferior a 0,005. Leer las absorbancias de las soluciones de hemoglobina a 415 nm contra el blanco de acetato de celulosa.

Cálculo

$$\%\ \text{Hb}\ A_2 = \frac{\text{Absorbancia de la Hb}\ A_2 \times 100}{\text{Absorbancia de la Hb}\ A_2 + (\text{Absorbancia de la Hb A} \times 4)}$$

Interpretación y comentarios

Para la interpretación de los resultados y de los intervalos de normalidad, véase la página 259. La variación de los valores duplicados que se obtengan deben estar dentro del 0,2%. Este método es inexacto en presencia de Hb C, Hb E y Hb O^{Arab} porque no se separan de la Hb A_2.

El procedimiento es útil para la medición de las variantes de la hemoglobina: en estos casos, el volumen de agua utilizado para la elución debe ajustarse a la cantidad aparente de la variante valorada según la electroforesis. Se debe prestar una atención especial al cortar las bandas en las que haya una variante de la hemoglobina (p. ej., Hb S) porque la separación entre la Hb S y la Hb A_2 es menos precisa.

Para obtener resultados exactos y precisos, utilizar la misma cubeta a la hora de leer la absorbancia del blanco, de la Hb A_2 y de la Hb A de cada muestra. Leer el blanco, la Hb A_2 y la Hb A en ese orden para minimizar los efectos de las sumas múltiples arrastradas. Algunos tipos de acetato de celulosa no son adecuados para la elución; esto se puede detectar por una lectura muy elevada del blanco. La concentración de hemoglobina del hemolizado es importante: la lectura de la absorbancia de la hemoglobina A_2 debe ser al menos el 0,1 de una unidad de absorbancia porque los valores bajos darán resultados bajos e inexactos de la Hb A_2.

Medición de la Hb A2 mediante cromatografía de microcolumnas

Principio

La cromatografía de microcolumnas depende del intercambio de grupos cargados entre la celulosa de recambio iónico y los grupos cargados en la molécula de la hemoglobina. Cuando se absorbe una mezcla de hemoglobinas en la celulosa, un componente particular de la hemoglobina puede eluirse de la columna utilizando un tampón (revelador) con un pH y/o fuerza iónica específicos, mientras que otros componentes (ya sean una hemoglobina simple o una mezcla de hemoglobinas) pueden eluirse cambiando el pH o la fuerza iónica del revelador. La separación de los componentes de la hemoglobina depende del pH y/o la fuerza iónica de los reveladores utilizados para el equilibrio de la columna y para la elución, del tipo de celulosa, del volumen de la muestra añadida, del tamaño de la columna, del gradiente, de los flujos y de la temperatura. Los siguientes métodos utilizan la dietilaminoetil (DEAE) celulosa como intercambiador de aniones (Whatman DE-52 microgranular predilatado), con reveladores tris-HCl[46] o con reveladores glicina-KCN[47].

Medición de la Hb A_2 mediante cromatografía de microcolumnas con tampones Tris-HCl[46]

Reactivos

Celulosa de intercambio iónico DE-52 (Whatman).

Tampón madre Tris, 1,0 mol/l. Tris, 121,1 g; agua hasta 1 l. Véase la nota en la página 252 relativa a los electrodos sensibles al Tris.

Tampón de trabajo 1. KCN, 200 mg; tampón madre, 100 ml; agua hasta 2 l; ajustar el pH a 8,5 con HCl concentrado.

Tampón de trabajo 2. KCN, 200 mg; tampón madre, 100 ml; agua hasta 2 l; ajustar el pH a 8,3 con HCl concentrado.

Tampón de trabajo 3. KCN, 200 mg; tampón de depósito, 100 ml; agua hasta 2 l; ajustar el pH a 7,0 con HCl concentrado.

Importante. Si los tampones se guardan a 4 °C, hay que llevarlos a temperatura ambiente antes de su utilización.

Método

1. Preparar la pasta de celulosa añadiendo 10 g de DE-52 a 200 ml del tampón 1. Mezclar suavemente y dejar que la celulosa se asiente. Decantar el sobrenadante y añadir otros 200 ml del tampón 1, mezclar suavemente durante 10 min; después, ajustar el pH de la celulosa en suspensión completa a 8,5 con HCl concentrado. Dejar que la celulosa se asiente, eliminar el sobrenadante y volver a suspender en otros 200 ml del tampón 1. Mezclar suavemente durante 10 min y asegurar que el pH sea de 8,5. Dejar que se asiente y eliminar el tampón suficiente como para que la celulosa asentada constituya aproximadamente la mitad del volumen total.
2. Colocar verticalmente unas pipetas cortas en la gradilla. Colocar una cuenta de vidrio de 3 mm o un trozo pequeño de algodón en la parte afilada de la pipeta para que actúe como soporte de la pasta de celulosa.
3. Llenar las pipetas con la pasta de celulosa completamente suspendida y dejar que la columna se compacte hasta una altura de 5-6 cm.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

4. Diluir 1 gota de hemolizado (100 g/l) en 5 gotas del tampón 1.
5. Cuando el exceso de tampón haya drenado de la columna, aplicar suavemente el lisado diluido a la parte superior de la columna y dejar que se absorba en la resina. No permitir que la superficie de la columna se seque.
6. Aplicar 8 ml de tampón 2 suavemente a la columna con un tubo de polietileno de 10-15 cm de longitud unido a la parte superior de la pipeta que actúa como reservorio. Recoger el eluido en un frasco de 10 ml y llegar hasta un volumen de 10 ml con el tampón 2.
7. Eluir la Hb A restante utilizando 10 ml del tampón 3; recoger el eluido y llegar hasta un volumen de 25 ml con el resto del tampón 3.
8. Leer la absorbancia de las hemoglobinas eluidas a 415 nm en un espectrómetro utilizando el agua como blanco.

Calcular la Hb A_2 de la siguiente forma:

$$\%\ \text{Hb}\ A_2 = \frac{A^{415}\ \text{Hb}\ A_2 \times 100}{A^{415}\ \text{Hb}\ A_2 + (2{,}5 \times A^{415}\ \text{Hb A})}$$

Interpretación y comentarios

Para la interpretación y los intervalos de normalidad, véase la página 259. La técnica no es adecuada en presencia de variantes de la hemoglobina (v. más adelante). Los factores que afectan a la garantía de calidad incluyen la concentración de hemoglobina aplicada a la columna, ya que la hemoglobina en exceso contaminará la fracción de la Hb A_2 con Hb A. Una cantidad inadecuada de hemoglobina producirá un eluido con una absorbancia demasiado baja para que la medición sea exacta.

El flujo de la columna puede ajustarse modificando la altura del reservorio sobre la columna. Un flujo de 10-20 ml/h resulta adecuado. La elevación del reservorio aumenta el flujo pero ensancha la banda de la Hb A_2 en la columna, lo cual no afectará a la cuantificación siempre que haya una separación adecuada. Para diluir la banda de la Hb A_2, se deben utilizar 8 ml del tampón 2; la mayor parte de esa cantidad debería eluirse entre 4 y 6 ml.

Medición de la Hb A_2 por cromatografía de microcolumnas+ con reveladores de cianuro potásico-glicina

El método descrito a continuación es adecuado para las muestras que contienen variantes tales como la Hb S. La elución de la Hb A_2 depende del pH del intercambiador de iones y de la molaridad del revelador[47].

Reactivos

Revelador A. Glicina, 15,0 g; KCN, 0,1 g; agua hasta 1 l.
Revelador B. NaCl, 9,0 g; agua hasta 1 l.
Celulosa de intercambio iónico DE-52 (Whatman).

Método

1. Preparar la pasta de celulosa añadiendo 50 g de DE-52 a 250 ml del revelador. Mezclar suavemente, dejar después que asiente y eliminar el sobrenadante. Repetir este proceso al menos dos veces, ajustar después el pH de la celulosa completamente suspendida a 7,6 con HCl, 0,1 mol/l.

   Si la pasta de celulosa es demasiado ácida hay que desecharla, porque cualquier intento para reajustarla aumentaría la concentración iónica total y alteraría por tanto el patrón de elución. La pasta de celulosa puede conservarse hasta 4 semanas, pero el pH debe comprobarse y si es necesario reajustarlo antes de su utilización.
2. Colocar verticalmente unas pipetas cortas en la gradilla. Colocar una cuenta de vidrio de 3 mm o un trozo pequeño de algodón en la parte afilada de la pipeta para que actúe como soporte de la pasta de celulosa.
3. Llenar las pipetas con la pasta de celulosa de DE-52 completamente suspendida y dejar que la columna se compacte por gravedad hasta una altura cercana a los 6 cm.
4. Comprobar cada lote de columnas con un hemolizado de Hb AS. La Hb A_2 debería eluirse en los primeros 3-4 ml y la Hb S en los siguientes 15-20 ml del revelador.
5. Diluir 1 gota del lisado (100 g/l) en 6 gotas del tampón.
6. Cuando el exceso de tampón haya drenado de la columna, aplicar suavemente el lisado diluido a la parte superior de la columna y dejar que se absorba en la resina. No permitir que la superficie de la columna se seque.
7. Aplicar el revelador A suavemente a la columna con un trozo de tubo de polietileno unido a la parte superior de la pipeta que actúa como reservorio. Hay que utilizar 3-4 ml de revelador para eluir la banda de la Hb A_2. Recoger el eluído en un frasco de 5 ml y llegar hasta un volumen de 5 ml con el revelador A.
8. Eluir la Hb A restante, o la Hb S + la Hb A, utilizando 15-20 ml del revelador B; recoger el eluido y llegar hasta un volumen de 25 ml con el revelador B. Si, en cualquier momento, el flujo a través de la columna se detiene, debe desecharse.
9. Leer la absorbancia de las hemoglobinas eluidas a 415 nm en un espectrómetro utilizando el agua como blanco.

Calcular la Hb A_2 de la siguiente forma:

$$\%\ \text{Hb}\ A_2 = \frac{A^{415}\ \text{Hb}\ A_2 \times 100}{A^{415}\ \text{Hb}\ A_2 + (5 \times A^{415}\ \text{Hb A})}$$

Modificación de la medición de la Hb S

Para calcular el porcentaje de la Hb S y de la hemoglobina restante así como el de la Hb A_2, la Hb A_2 se eluye en los primeros 3-4 ml con el revelador A, la Hb S se eluye en los siguientes 15-20 ml del mismo revelador A y la hemoglobina restante se eluye con el revelador B. El eluido que contiene la Hb A_2 se diluye hasta los 5 ml y los eluidos que contienen la Hb S y la hemoglobina restante se diluyen hasta los 25 ml. Para asegurar la elución de toda la Hb A_2 en los primeros 3-4 ml y de toda la Hb S en los siguientes 15-20 ml, es posible que haya que reajustar el pH del intercambiador iónico después de un cromatograma de prueba[47].

Interpretación y comentarios

Los porcentajes de la Hb A_2 tienden a ser ligeramente inferiores utilizando el sistema de tampón Tris, pero con cada uno de los procedimientos debe distinguirse entre los sujetos normales y con rasgo talasémico β clásico[46]. Una ventaja del método de la glicina-KCN es su menor sensibilidad a los pequeños cambios en el pH del revelador; también puede utilizarse para las muestras que contienen Hb S.

Hay que indicar que la medición de la Hb A_2 en presencia de Hb S no suele ser una prueba muy útil. No se requiere para distinguir el rasgo de células falciformes de la talasemia de células falciformes/β^+ y no siempre es fiable para diferenciar la anemia de células falciformes de la talasemia de células falciformes/β^0 porque a menudo interacciona con el rasgo talasémico α. En estas circunstancias, los estudios familiares pueden ser extremadamente útiles.

Medición de la Hb A_2 mediante cromatografía líquida de alta resolución

El principio de la HPLC se ha explicado en la página 245. Cuando se utiliza esta tecnología como método principal para detectar las variantes de las hemoglobinas, la cuantificación simultánea de la Hb A_2 y de la Hb F puede sustituir a tres métodos tradicionales distintos: la electroforesis de la hemoglobina, la cuantificación de la Hb A_2 y la cuantificación de la Hb F. Cada laboratorio debe establecer sus propios intervalos de referencia para la cuantificación de la Hb A_2 con este método, que deberían ser similares a los intervalos ya publicados. Dado que la cuantificación de la Hb A_2 puede ser inexacta en presencia de ciertas variantes de la hemoglobina, tales como la Hb E, la Hb Lepore y la Hb S[32], es necesario inspeccionar siempre cada cromatograma. La inspección permitirá también la identificación de especímenes con una banda A_2 partida, resultado de la heterocigosidad para una variante de la cadena δ. Si la magnitud de una hemoglobina con el tiempo de retención de la Hb A_2 es mayor de lo esperado, se debe aplicar una técnica alternativa para confirmar su identidad ya que un valor pico etiquetado como Hb A_2 puede ser Hb E u otra hemoglobina eluida con la Hb A_2.

INTERPRETACIÓN DE LOS VALORES DE LA HB A_2

Los valores de la Hb A_2 han de interpretarse en relación con el intervalo de referencia establecido por cada laboratorio individual utilizando muestras de sangre de la población local con índices normales, tanto eritrocitarios como de Hb[11,48-51]. Hay que seguir estrictamente el procedimiento de trabajo estándar para el método pertinente y determinar el 95% de los intervalos de referencia. Los intervalos pueden variar ligeramente entre los distintos métodos y entre los distintos laboratorios. Por ejemplo, en uno de nuestros laboratorios el intervalo determinado para la cromatografía de microcolumnas fue de 2,2-3,3%, mientras que en el otro fue de 2,3-3,5%. Las variables técnicas que afectan al intervalo de referencia pueden incluir la utilización de concentrado de hematíes en vez de sangre total. Los resultados obtenidos por el análisis HPLC pueden ser 0,1-0,2% superiores a los resultados obtenidos por electroforesis con elución. Una vez que se ha determinado el intervalo de referencia, persiste un problema práctico con los resultados límite, dado que los cálculos repetidos pueden variar en un 0,1-0,2%. Recomendamos que los valores de la Hb A_2 de 3,4-3,7% sean interpretados como límite y que se repita el análisis sobre la misma muestra y sobre una muestra fresca. También hay evidencia de que la Hb A_2 se eleva en pacientes con VIH[52,53].

Cuando se realizan los análisis para el asesoramiento genético, puede ser de utilidad investigar al compañero en caso de obtener resultados límite.

El porcentaje de la Hb A_2 debe interpretarse conociendo los índices eritrocitarios y de la Hb (tabla 12.7).

CUANTIFICACIÓN DE LA HB F

La Hb F puede calcularse por diversos métodos basados en su resistencia a la desnaturalización a pH alcalino, por HPLC o por un método inmunológico[54]. Entre los métodos de desnaturalización alcalina, el de Betke y cols.[55] es fiable para pequeñas cantidades (<10-15%) de Hb F, mientras que para valores de más del 50%, y en sangre del cordón umbilical, es preferible utilizar el método de Jonxis y Visser[56]; sin embargo, este método no es fiable para valores inferiores al 10%.

Hay métodos inmunológicos diseñados para medir la Hb F por inmunodifusión[57], que están disponibles comercialmente[a] y por análisis de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA)[58].

Método de Betke modificado para la estimación de la Hb F

Principio

Para medir el porcentaje de Hb F en una mezcla de hemoglobinas[55], se añade hidróxido sódico a un lisado y, tras un tiempo establecido, se detiene la desnaturalización añadiendo sulfato de amonio saturado. El sulfato de amonio reduce el pH y precipita la hemoglobina desnaturalizada. Tras la filtración, se mide la cantidad de hemoglobina desnaturalizada (sin precipitar). Se calcula entonces la proporción de hemoglobina resistente a álcalis (fetal) como porcentaje de la cantidad total de hemoglobina presente.

Equipo

Papel de filtro. Whatman n.º 42.
Mezclador de vórtice.
Tubos de vidrio.

Reactivos

Solución de cianuro. Cianuro potásico 25 mg; ferrocianuro potásico, 100 mg. Disolver en 500 ml de agua destilada. Almacenar en un frasco oscuro.

[a] Helena Laboratories, Beaumont, Texas, Estados Unidos.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 12.7. Interpretación de los valores de la Hb A_2

Intervalo de la Hb A_2 (%)	Interpretación
>7,0	Los valores de la Hb A_2 >7,0% son extremadamente raros Excluir una variante estructural Repetir el cálculo de la Hb A_2 Mutaciones raras de la talasemia β
3,8–7,0	Rasgo talasémico β, hemoglobina inestable
3,4–3,7	Déficit grave de hierro en el rasgo talasémico β Variante adicional de la cadena δ con el rasgo talasémico β (Debe medirse la A_2 total) Interacción de la talasemia α y β Mutaciones raras de la talasemia β Presencia de la Hb S, dificultando la medición precisa Interacción de la talasemia α y de la Hb S Error analítico; repetir el análisis
2,0–3,3	Normal Talasemia δ β (si la Hb F está elevada) Casos raros de Rasgo talasémico β, incluyendo coexistencia de Talasemias β y δ y coexistencia de Talasemias β y α Rasgo talasémico α
<2,0	Talasemia δ β (si la Hb F está elevada) Rasgo talasémico α Enfermedad de la Hb H Presencia de una variante adicional de la cadena δ (debe medirse la Hb A_2 total) Talasemia δ Déficit de hierro

Solución de sulfato amónico saturado. Hervir 1 l de agua y añadir sulfato amónico hasta que se sature la solución. Enfriar y equilibrar a 20 °C antes de su utilización.

Hidróxido sódico, 1,2 mol/l. Hidróxido sódico, 4,8 g; agua destilada hasta 100 ml. Preparar cada mes. Equilibrar a 20 °C antes de su utilización.

Método

1. Preparar un lisado como se describe en la página 241. El lisado puede almacenarse a 4 °C hasta una semana antes de su utilización.
2. Añadir 0,25 ml de lisado a 4,75 ml de solución de cianuro para preparar una solución de cianmetahemoglobina (HiCN).
3. Transferir 2,8 ml de la solución de cianmetahemoglobina a un tubo de ensayo de vidrio y dejar que se equilibre a 20 °C.
4. Introducir 0,2 ml de NaOH, 1,2 mol/l y mezclarlos en un mezclador de vórtice durante 2-3 s.
5. A los 2 min exactos, introducir 2 ml de solución de sulfato amónico saturado y mezclarlos en el mezclador de vórtice. Dejar reposar los tubos durante 5-10 min a 20 °C.
6. Filtrar dos veces a través del mismo papel de filtro Whatman n.º 42, utilizando un tubo de ensayo limpio para recoger el filtrado en cada ocasión. Si el filtrado no está completamente claro, filtrar de nuevo a través del mismo papel. El filtrado contiene la hemoglobina resistente a álcalis.
7. Para medir la hemoglobina total, transferir 0,4 ml de la solución de cianmetahemoglobina del paso 2 a otro tubo y añadir 13,9 ml de agua.
8. Leer la absorbancia de la hemoglobina resistente a álcalis y de la hemoglobina total a 420 nm contra agua como blanco.
9. Calcular el porcentaje de la hemoglobina resistente a álcalis de la siguiente forma:

$$\%\ \text{Hemoglobina resistente a álcalis} = \frac{A^{420}\ \text{Hb resistente a álcalis}}{A^{420}\ \text{total Hb} \times 20} \times 100$$

Interpretación y comentarios

La elevación de la Hb F obedece a diversas causas (v. página 261). En circunstancias muy excepcionales, también presentarán resistencia a los álcalis otras hemoglobinas anómalas, dando resultados elevados. Es imperativo que, en muestras con un aumento de la HbF, se practique electroforesis o HPLC para excluir la posibilidad de que haya una variante inusual.

Se debe estudiar un control con Hb F normal y otro con HbF elevada con cada serie de análisis de muestras. El control de la Hb F elevado debe contener, de forma ideal, entre un 5 y un 15% de Hb F y puede prepararse a partir de una mezcla de sangre de cordón umbilical y de adulto. Cada laboratorio debe verificar su propio intervalo de normalidad, que no debería diferir de forma significativa de los valores publicados; para adultos el intervalo es 0,2-1,0%.

Zago y cols.[59] notificaron una variabilidad en la capacidad de los diferentes lotes de papel de filtro para absorber la hemoglobina del filtrado, lo que produjo bajos resultados. Es necesario equilibrar la temperatura de los reactivos a 20 °C y controlar la temperatura de reacción a 20 °C para obtener resultados exactos y reproducibles.

Método de Jonxis y Visser

Principio

El aumento de la resistencia de la Hb F a la desnaturalización por los álcalis se detecta registrando el cambio en la absorción a 576 nm en cada minuto, producido por la adición de hidróxido de amonio[56]. En esta longitud de onda, la absorción de la oxihemoglobina difiere de la del hemocromógeno alcalino formado en la desnaturalización.

Cuando el logaritmo del porcentaje de la hemoglobina que permanece sin desnaturalizar se representa contra el

tiempo, se obtiene una línea recta. Extrapolando al tiempo cero, se puede calcular el porcentaje de la Hb F en la muestra original.

Reactivos

Solución de hidróxido de amonio. NH_4OH, 100 g; agua hasta 1 l.

Solución de hidróxido sódico, 0,06 mol/l. Hidróxido sódico, 2,4 g; agua hasta 1 l.

Método

1. Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de su utilización. Añadir 0,1 ml de sangre o de lisado (100 g/l) a 10 ml de agua y mezclarlos.
2. Añadir 2 gotas de solución de hidróxido amónico y mezclar.
3. Medir la absorbancia en un espectrofotómetro a 576 nm (A_B).
4. Añadir 0,1 ml de la misma sangre o del mismo lisado a 10 ml de solución de hidróxido sódico; a continuación añadir 2 gotas de solución de hidróxido amónico y mezclar completamente.
5. Medir la absorbancia en un espectrómetro a 576 nm cada minuto durante 15 min (A_T); después incubar la solución a 37 °C durante 15 min, enfriar hasta la temperatura ambiente y medir la absorbancia (A_E). La proporción A_B:A_E debe ser constante.
6. Calcular el porcentaje de la hemoglobina no desnaturalizada en cada minuto de la siguiente forma:

$$\frac{A_T^{576} - A_E^{576}}{A_B^{576} - A_E^{576}} (\times 100)$$

Representar el porcentaje en la escala logarítmica de un papel semilogarítmico contra el tiempo. Debería obtenerse una línea recta a partir de la cual se pueda encontrar por extrapolación la cantidad original de Hb F en el tiempo cero.

Interpretación y comentarios

Los comentarios relativos a los controles y a los intervalos de normalidad dados para el método de Betke son también aplicables para este método.

Además, el método de Jonxis y Visser requiere un espectrómetro preciso porque el pico de absorción máxima a 576 nm es muy estrecho y la diferencia en la extinción entre la oxihemoglobina y el hemocromógeno alcalino es relativamente pequeña.

Para la interpretación de los resultados, véase la página 262.

Inmunodifusión radial

Para la cuantificación de la Hb F se puede utilizar el procedimiento de la inmunodifusión radial[57]. El principio se basa en una reacción antígeno anticuerpo; el anti-Hb F está ya incorporado al medio de soporte en fase gel, lo que produce la formación de un anillo opaco de precipitación visible.

El cuadrado del diámetro de este anillo es directamente proporcional a la concentración de la Hb F. Hay que preparar una curva estándar a partir de las muestras que contienen valores conocidos de Hb F representados contra sus concentraciones de hemoglobina. Helena Laboratories comercializa un equipo que contiene placas preparadas, un microdispensador y un dispositivo de medición.

El método es sencillo, pero la formación de los anillos de precipitación necesita al menos 18 h de incubación a temperatura ambiente. Por tanto, no es posible un diagnóstico rápido. Hay que tener cuidado al aplicar la muestra, porque, si se dañan los pocillos de la placa, se originarán anillos de precipitación asimétricos y mediciones erróneas.

EVALUACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN INTRACELULAR DE LA HB F

Las diferencias en la distribución intracelular de la Hb F se utilizan para diferenciar entre los heterocigotos para la talasemia δβ y el tipo africano clásico de la PHHF. En la primera se puede demostrar que no todos los hematíes contienen Hb F (distribución heterocelular), mientras que en la última todas las células contienen Hb F (distribución pancelular), aunque existen variabilidades intracelulares en el contenido. Se ha sugerido que la distribución heterocelular puede ser más aparente que real y que únicamente indica que los valores elevados de Hb F tienden a dar una distribución más pancelular que los valores más bajos. Por este motivo, los resultados se deben tratar con cuidado y no utilizarlos para hacer un diagnóstico de forma aislada.

Se han utilizado ampliamente dos técnicas para demostrar la distribución intracelular de la Hb F. La más frecuentemente utilizada es la prueba de elución ácida de Kleihauer[60] que fue desarrollada originariamente para la detección de hematíes fetales en la circulación materna después de una hemorragia transplacentaria. Este método se describe en la página 272. Menos habitualmente utilizada es la técnica de inmunofluorescencia, más sensible, descrita a continuación.

Método inmunofluorescente

Principio

El anticuerpo anti-Hb F se une específica y cuantitativamente a la Hb F en los hematíes fijados. Estas células pueden identificarse tras el tratamiento con un segundo anticuerpo marcado con fluorescencia y dirigido contra el anti-Hb F[14].

Equipo

Portaobjetos de vidrio.

Cubetas de Coplin.

Microscopio. Equipado con accesorios para la fluorescencia ultravioleta (UV).

Cámara húmeda. Realizada con una placa de Petri con un papel de filtro humedecido en el fondo.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Reactivos

Solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,1. Véase la página 589.

Suero de conejo anti-Hb F humana. Diluir el antisuero en PBS en proporción 1:64; almacenar en partes alícuotas pequeñas a –20 °C. Es estable durante varios meses.

Inmunoglobulina anticonejo de oveja (o de cabra) marcada con isotiocianato de fluoresceína. Diluir en PBS en proporción 1:32; almacenar en alícuotas pequeñas a –20 °C. Es estable durante varios meses.

Fijador. Acetona, 90 ml; metanol, 10 ml.

Método

1. Preparar extensiones sanguíneas finas y dejarlas secar durante toda la noche.
2. Fijar durante 5 min a temperatura ambiente, deshacerse del exceso de fijador y aclarar inmediatamente en PBS. Si las extensiones son demasiado gruesas, se despegarán en esta fase.
3. Aclarar los portaobjetos con agua y dejarlos secar.
4. Depositar 5 µl del antisuero anti-Hb F en el portaobjetos.
5. Incubar en la cámara húmeda a 37 °C durante 30 min o a temperatura ambiente durante 60 min.
6. Aclarar los portaobjetos concienzudamente en el PBS para eliminar restos de antisuero no fijado.
7. Aclarar los portaobjetos con agua y dejarlos secar.
8. Depositar 5 µl del antisuero anticonejo en el portaobjetos.
9. Incubar en la cámara húmeda a 37 °C durante 30 min o a temperatura ambiente durante 60 min.
10. Aclarar los portaobjetos concienzudamente en el PBS para eliminar restos de antisuero no fijado.
11. Aclarar los portaobjetos con agua y dejarlos secar.
12. Examinar con el microscopio utilizando un objetivo ×40 y los filtros adecuados para usar con el isotiocianato de fluoresceína. Para cuantificar el número de células que contienen Hb F, contar el número total de células en un campo con luz blanca utilizando una rejilla en el ocular y después el número de células teñidas bajo la luz UV. Si el valor de Hb F es inferior al 10%, se deben contar al menos 2.000 células.

Comentarios

En los adultos normales, del 0,1 al 7,0% de las células muestran una fluorescencia detectable. La proporción de células positivas se correlaciona bien con el porcentaje de Hb F medida por desnaturalización alcalina a niveles entre 0,5 y 5,0%. Es posible detectar incluso cantidades de tan sólo 1 pg de Hb F por célula, lo que proporciona una sensibilidad mucho mayor que el método de elución ácida. No obstante, este aumento de la sensibilidad puede hacer que una distribución heterocelular aparezca como pancelular si la proporción de Hb F es superior al 10%[54].

Interpretación de los valores de la Hb F[11,14]

Véase la tabla siguiente:

Valores de Hb F (%)	Interpretación
0,2–1,0	Resultados normales
1,0–5,0	En aproximadamente el 30% de los rasgos talasémicos β Algunos heterocigotos de una variante de la hemoglobina Algunos homocigotos de una variante de la hemoglobina Algunos heterocigotos compuestos de una variante de la hemoglobina y de talasemia β Algunos individuos con trastornos hematológicos (anemia aplásica, síndromes mielodisplásicos, leucemia mielomonocítica juvenil) Algunas mujeres embarazadas (segundo trimestre) Esporádicamente en la población general, sobre todo en los afrocaribeños (representando la heterocigosidad para la PHHF sin deleciones)
5,0–20,0	Casos ocasionales de rasgo talasémico β Algunos homocigotos de una variante de la hemoglobina Algunos heterocigotos compuestos de una variante de la hemoglobina y de la talasemia β Algunos tipos de talasemia δβ PHHF heterocigota
15,0–45,0	Tipo africano de la PHHF heterocigota (habitualmente más del 20%) Algunos casos de talasemia β intermedia
>45,0	Talasemia β mayor Algunos casos de talasemia β intermedia Neonatos
>95,0	PHHF tipo africano homocigota (por deleción) Algunos neonatos (sobre todo si son prematuros)

EVALUACIÓN DEL ESTADO DEL HIERRO EN LA TALASEMIA

El déficit concomitante de hierro dificulta el diagnóstico del rasgo talasémico porque enmascara el cuadro sanguíneo típico y puede reducir la síntesis de la Hb A_2[48,49,51]. En el rasgo talasémico β, el valor de la Hb A_2 puede estar reducido hasta un valor límite o incluso a valores normales (3,0-3,5%), dependiendo de la gravedad de la anemia. Sin embargo, en muchos pacientes con rasgo talasémico β y déficit de hierro, la Hb A_2 puede estar aumentada.

En presencia de un déficit de hierro no debería investigarse, si es posible, la presencia del rasgo talasémico. Los depósitos de hierro se rellenan habitualmente tras 3-4 meses de tratamiento con hierro. Sin embargo, si existe la sospecha de que una mujer embarazada presenta un rasgo talasémico, no se puede esperar a la corrección del déficit de hierro para establecer el diagnóstico. Se debe realizar sin demora un análisis del ADN de los genes de la globina de la mujer y de su compañero si en ambos se sospecha la presencia de rasgo talasémico (v. cap. 21, pág. 482).

Además de los métodos tradicionales para la valoración de hierro, tales como la medición de la ferritina sérica o del hierro sérico más la capacidad de fijación total de hierro, la estimación de la protoporfirina de cinc (v. págs. 129 y 171) tiene un valor potencial. Esta prueba puede realizarse en una muestra con EDTA en un laboratorio de hematología y es una medida de la incorporación del hierro a nivel celular.

INCLUSIONES ERITROCITARIAS

Las inclusiones eritrocitarias más importantes halladas en las hemoglobinopatías son los cuerpos de inclusión de la Hb H (tetrámeros precipitados de la cadena β) encontrados en la talasemia α[61], inclusiones de la cadena α encontrados en la talasemia β mayor[7,62] y cuerpos de Heinz encontrados en las enfermedades con hemoglobina inestable[42,63].

Las cadenas α precipitadas se encuentran en el citoplasma de los precursores eritrocitarios nucleados de pacientes con talasemia β mayor; pueden demostrarse mediante tinción supravital de la médula ósea con violeta de metilo (igual que los cuerpos de Heinz) y aparecer como cuerpos con formas irregulares próximos al núcleo de los normoblastos. Tras la esplenectomía se pueden también hallar normoblastos y reticulocitos en sangre periférica. Los cuerpos de Heinz (cadenas insolubles de globina desnaturalizada) se forman como resultado de la exposición a fármacos o a químicos oxidantes y se desarrollan espontáneamente en el déficit de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) y en las enfermedades con hemoglobina inestable. Habitualmente, sólo se observan en sangre periférica tras una esplenectomía. Cuando se deben a la presencia de una hemoglobina inestable, se pueden demostrar en la sangre periférica de los pacientes con un bazo intacto si su sangre se conserva a 37 °C durante 24-48 h. El uso del violeta de metilo y del azul de cresil brillante para la demostración de la cadena α precipitada y de los cuerpos de Heinz se describe en la página 270.

Demostración de los cuerpos de inclusión de la Hb H

Reactivo

Solución de tinción. Azul de cresil brillante al 1% o nuevo azul de metileno. Los nuevos lotes del colorante deben probarse con un control positivo conocido porque la acción redox de los colorantes puede variar de lote a lote.

Método

1. Mezclar 2 volúmenes de sangre fresca (antes de las 24 h desde su recogida) con 1 volumen de solución de tinción.
2. Incubar a 37 °C durante 2 h o a temperatura ambiente durante 4 h.
3. Volver a suspender las células y realizar una extensión sanguínea delgada.
4. Examinar las extensiones como para un recuento de reticulocitos. Los cuerpos de inclusión aparecen como múltiples puntos verde-azulados, como el patrón punteado de una pelota de golf (v. pág. 271). Pueden distinguirse fácilmente de los reticulocitos, los cuales exhiben un material reticular desigual o puntos finos poco frecuentes.

Interpretación y comentarios

En el rasgo talasémico α^+ sólo se observa muy ocasionalmente un cuerpo H (1:1.000 a 1:10.000); son más numerosos en la talasemia α^0, pero el número de células que desarrollan inclusiones no es fiable para diferenciar los diversos patrones de deleción de genes que se observan en la talasemia α y la ausencia de inclusiones demostrables no excluye el diagnóstico de rasgo talasémico α. Esta prueba es más útil en la enfermedad de la Hb H, donde las inclusiones se encuentran habitualmente en más del 30% de los hematíes.

DIAGNÓSTICO FETAL DE LOS TRASTORNOS DEL GEN DE LA GLOBINA

El diagnóstico prenatal de los trastornos del gen de la globina[20] se lleva a cabo si el feto presenta un riesgo de talasemia mayor o una forma grave de enfermedad falciforme, como la drepanocitosis. Disponemos de dos vías para el diagnóstico fetal: la síntesis de la cadena de globina (utilizada si no se dispone del padre putativo) y el análisis del ADN. El ADN puede obtenerse de una muestra de la vellosidad coriónica o del líquido amniótico. Los métodos utilizados para el análisis del ADN se describen en el capítulo 21.

Las parejas detectadas con riesgo potencial necesitarán asesoramiento y si solicitan el diagnóstico fetal, será preciso confirmar el fenotipo de la hemoglobina de los padres. Las muestras de sangre de los padres o de la familia se envían al centro de diagnóstico y se acuerda la fecha para la obtención de la muestra fetal.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Requisitos de la muestra

Las muestras de sangre para la síntesis de la cadena de globina han de ser frescas (recibidas a las pocas horas de su extracción) y transportadas a 4 °C. Las muestras de sangre para el análisis del ADN pueden enviarse por transporte nocturno sin refrigeración pero deben procesarse, como mucho, a los 3 días de su extracción. Se necesitan 10 ml de sangre en EDTA o en heparina de cada progenitor. Si se requiere un análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) se necesitarán las siguientes muestras adicionales: sangre ya sea de un niño homocigoto normal o afectado, o de un niño heterocigoto y de sus abuelos, maternos o paternos, o, si no disponemos del niño, sangre de los dos grupos de abuelos. Las muestras deben etiquetarse de forma clara y cuidadosa y hay que confeccionar el árbol genealógico familiar. Se deben dar los detalles de cada una de las pruebas hematológicas.

Hay que desprender cualquier tejido materno de las muestras de la vellosidad coriónica y enviarlas por correo nocturno urgente en un medio de cultivo de tejidos o, de preferencia, en un tampón especial obtenible del laboratorio de diagnóstico del ADN. Se deben recibir las muestras del líquido amniótico (se necesitan 15-20 ml) antes de las 24 h de su recogida. Si el tiempo de tránsito va a ser superior, hay que volver a suspender a los amniocitos en un medio de cultivo de tejidos.

El laboratorio que realiza el análisis del ADN para los trastornos de la síntesis de la cadena de la globina debe recibir una información exacta sobre el origen étnico preciso de los miembros de la familia, de forma que se haga un uso óptimo del ADN disponible para el diagnóstico.

Es esencial la obtención de los datos de seguimiento de todos los casos en los que se haya realizado un diagnóstico fetal. Debe incluir las pruebas de la muestra de sangre del cordón umbilical o del talón en el nacimiento y una prueba a los 6 meses para confirmar el estado de portador. Cuando sea posible, se debe realizar el análisis del ADN de los genes de la globina del niño.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hardison R, Miller W (Updated) Globin gene server. www.globin.cse.psu.edu.
2. Serjeant GR, Sergeant BE 2001 Sickle cell disease, 3rd ed. Oxford University Press, Oxford.
3. Dacie JV 1988 The haemolytic anaemias, vol 2: The hereditary haemolytic anaemias, 3rd ed. p 322. Churchill Livingstone, Edinburgh.
4. White JM 1974 The unstable haemoglobin disorders. Clinics in Haematology 3:333-356.
5. Stephens AD 1977 Annotation: Polycythaemia and high affinity haemoglobins British Journal of Haematology 36:153-159.
6. Kiese M 1974 Methemoglobinemia: A complete treatise. CRC Press, Cleveland, OH.
7. Weatherall DJ, Clegg JB 2001 The thalassaemia syndromes, 4th ed. Blackwell Science, Oxford.
8. Flint J, Harding RM, Boyce AJ, Clegg JB 1998. The population genetics of haemoglobinopathies. Baillière's Clinical Haematology, 11:1-51.
9. Thein SL 1998 β-thalassaemia. Baillière's Clinical Haematology, 11:91-126
10. Thein SL 2000 β thalassaemia. Fifth Congressof the European Haematology Association. In: Green AR (ed), Educational Book, Birmingham,p. 132-137
11. British Committee for Standards in Haematology 1994 Guidelines for the investigation of the α and β thalassaemia traits. Journal of Clinical Pathology 47:289-295.
12. Higgs DR 1993 β-Thalassaemia. Baillière's Clinical Haematology, 6:117-150.
13. Wood WG 1993 Increased Hb F in adult life. Baillière's Clinical Haematology, 6:177-213.
14. Wood WG, Stamatoyannopoulos G, Lim G, et al 1975 F cells in the adult: normal values and levels in individuals with hereditary and acquired elevations of Hb F. Blood 46:671-682.
15. Wild BJ, Green BN, Cooper EK et al 2001 Rapid identification of hemoglobin variants by electrospray ionization mass spectrometry. Blood Cells, Molecules and Diseases 27:691-704.
16. Wild BJ, Bain BJ 2004 Detection and quantitation of normal haemoglobins: an analytical review. Annals of Clinical Biochemistry 41:1-15.
17. Lafferty JD, Crowther MA, Ali MA, et al 1996 The evaluation of various mathematical RBC indices and their efficacy in discriminating between thalassemic and non-thalassemic microcytosis. American Journal of Clinical Pathology 106: 201-205.
18. Eldibany MM, Totonchi KF, Joseph NJ, et al 1999 Usefulness of certain red blood cell indices in diagnosing and differentiating thalassemia trait from iron deficiency anemia. American Journal of Clinical Pathology 111:676-682.
19. Stephens AD, Wild BJ 1990 Quality control in haemoglobinopathy investigations. Methods in Hematology 22:72-85.
20. British Committee for Standards in Haematology 1988 Guidelines for haemoglobinopathy screening. Clinical and Laboratory Haematology 10:87-94.
21. British Committee for Standards in Haematology 1994 Guidelines for fetal diagnosis of globin gene disorders. Journal of Clinical Pathology 47:199-204.
22. International Committee for Standardization in Haematology 1988 Recommendations for neonatal screening for haemoglobinopathies. Clinical and Laboratory Haematology 10:335-345.
23. British Committee for Standards in Haematology Working Party of the General Haematology Task Force 1998 The laboratory diagnosis of haemoglobinopathies. British Journal of Haematology 101:783-792.
24. International Committee for Standardization in Haematology 1978 Simple electrophoretic system for presumptive identification of abnormal hemoglobins. Blood 52:1058-1064.
25. International Committee for Standardization in Haematology 1978 Recommendations for a system for identifying abnormal hemoglobins. Blood 52:1065-1067.
26. Schneider RG 1974 Identification of hemoglobin by electrophoresis. In: Schmidt RM, Huisman THJ, Lehmann H (eds) The detection of hemoglobinopathies, p.11. CRC Press, Cleveland, OH.
27. Marder VJ, Conley CL 1959 Electrophoresis of hemoglobin on agar gel. Frequency of hemoglobin D in a Negro population. Bulletin of the Johns Hopkins Hospital 105:77-88.

28. Schroeder WA, Shelton JB, Shelton JR 1980 Separation of hemoglobin peptides by high performance liquid chromatography HPLC. Hemoglobin 4:551-559.
29. Wild BJ, Stephens AD 1997 The use of automated HPLC to detect and quantitate haemoglobins. Clinical and Laboratory Haematology 19:171-176.
30. Phelan L, Bain BJ, Roper D, et al 1999 An analysis of relative costs and potential benefits of different policies for antenatal screening for β thalassaemia trait and variant haemoglobins. Journal of Clinical Pathology 52:697-700.
31. Riou J, Godart CM, Hurtrel D, et al 1997 Cation-exchange HPLC evaluated for presumptive identification of hemoglobin variants. Clinical Chemistry 43:34-39.
32. Head CE, Conroy M, Jarvis M et al 2004 Some observations on the measurement of haemoglobin A_2 and S percentages by high performance liquid chromatography in the presence and absence of thalassaemia. Journal of Clinical Pathology 57:276-280.
33. Millar CM, Phelan L, Bain BJ 2002 Diabetes mellitus diagnosed following request for haemoglobin electrophoresis. Lancet 117:778.
34. Righetti PG, Gianazza E, Bianchi-Bosisio A, et al 1986 The hemoglobinopathies: conventional isoelectric focusing and immobilized pH gradients for hemoglobin separation and identification. Methods in Hematology 15:47-71.
35. Basset P, Beuzard Y, Garel MC, et al 1978 Isoelectric focusing of human hemoglobins: its application to screening to characterization of70 variants and to study of modified fractions of normal hemoglobins. Blood 51:971-982.
36. Ueda S, Schneider RG 1969. Rapid identification of polypeptide chains of hemoglobin by cellulose acetate electrophoresis of hemolysates. Blood 34:230-235.
37. Schneider RG 1974 Differentiation of electrophoretically similar hemoglobins ì such as S, D, G and P or A_2, C, E and O by electrophoresis of the globin chains. Clinical Chemistry 20:1111-1115.
38. Evatt BL, Gibbs WN, Lewis SM, et al 1992 Fundamental diagnostic hematology: Anemia, 2nd ed. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta and World Health Organization, Geneva.
39. NHS Sickle cell and thalassemia screening programme. www.kcl-phs.org.uk/haemscreening.
40. Carrell RW 1986 The hemoglobinopathies: methods of determining hemoglobin instability (unstable hemoglobins). Methods in Haematology 15:109-124.
41. Grimes AJ, Meisler A 1962 Possible cause of Heinz bodies in congenital Heinz body anaemia. Nature 194:190-191.
42. Grimes AJ, Meisler A, Dacie JV 1964 Congenital Heinz-body anaemia: further evidence on the cause of Heinz-body production in red cells. British Journal of Haematology 10:281-290.
43. Carrell RW, Kay R 1972 A simple method for the detection of unstable haemoglobins. British Journal of Haematology 23:615-619.
44. Marengo-Rowe AJ 1965 Rapid electrophoresis and quantitation of hemoglobins on cellulose acetate. Journal of Clinical Pathology 18:790-792.
45. International Committee for Standardization in Haematology 1978 Recommendations for selected methods for quantitative estimation of Hb A2 and for Hb A2 reference preparation. British Journal of Haematology 38:573-578.
46. Efremov GD, Huisman THJ, Bowman K, et al 1974 Microchromatography of hemoglobins: II A rapid method for the determination of Hb A2. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 83:657-664.
47. Huisman THJ, Schroeder WA, Brodie AR, et al 1975 Microchromatography of hemoglobins III. A simplified procedure for the determination of hemoglobin A_2. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 86:700-702.
48. Kattamis C, Panayotis L, Metaxotou-Mavromati A, et al 1972 Serum iron and unsaturated iron binding capacity in b thalassaemia trait: their relation to the levels of Hb A, A_2 and F. Journal of Medical Genetics 9:154-159.
49. Alperin JB, Dow PA, Peteway MB 1977 Hemoglobin A2 levels in health and various hematological disorders. American Journal of Clinical Pathology 67:219-226.
50. Efremov GD 1986 The hemoglobinopathies: quantitation of hemoglobins by microchromatography. Methods in Hematology 15:72-90.
51. Wasi P, Na-Nakorn S, Pootrakul S, et al 1969 Alpha- and beta-thalassemia in Thailand. Annals of New York Academy of Sciences 165:60-82.
52. Routy J, Monte M, Beaulieu R, et al 1993 Increase of haemoglobin A_2 in human immuno-deficiency virus-1-infected patients treated with zidovudine. American Journal of Hematology 43:86-90.
53. Howard J, Henthorn JS, Murphy S, et al 2005 Implications of increased haemoglobin A2 values in HIV positive women in the antenatal clinic, Journal of Clinical Pathology 58:556-558.
54. Felice AE 1986. The hemoglobinopathies: quantitation of fetal hemoglobin. Methods in Hematology 15:91-108.
55. Betke K, Marti HR, Schlicht L 1959 Estimation of small percentage of foetal haemoglobin. Nature 184:1877-1878.
56. Jonxis JHP, Visser HKA 1956 Determination of low percentages of fetal hemoglobin in blood of normal children. American Journal of Diseases of Children 92:588-591.
57. Chudwin DS, Rucknagel DL 1974 Immunological quantification of hemoglobins F and A_2. Clinica Chimica Acta 50:413-418.
58. Makler MT, Pesce AJ 1980 ELISA assay for measurement of hemoglobin A and hemoglobin F. American Journal of Clinical Pathology 74:673-676.
59. Zago MA, Wood WG, Clegg JB, et al 1979. Genetic control of F-cells in human adults. Blood 53:977-986.
60. Kleihauer E 1974 Determination of fetal hemoglobin: elution technique. In: Schmidt RM, Huisman THJ, Lehmann H (eds) The detection of hemoglobinopathies, p.20, CRC Press, Cleveland, OH.
61. Weatherall DJ 1983 The thalassemias: haematologic methods. Methods in Haematology 6:27-30.
62. Fessas P 1963 Inclusions of hemoglobin in erythroblasts and erythrocytes of thalassemia. Blood 21:21-32.
63. White JM, Dacie JV 1971 The unstable hemoglobins ì molecular and clinical features. Progress in Hematology 7: 69-102.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

13 Citoquímica eritrocitaria y leucocitaria

David Swirsky y Barbara J. Bain

Citoquímica eritrocitaria	267	Reacción de la fosfatasa ácida	275
Siderocitos y sideroblastos	267	Reacción del ácido peryódico de Schiff	277
Derivados de la hemoglobina	270	Esterasas	279
Citoquímica leucocitaria	273	Naftol AS-D cloroacetato esterasa	280
Mieloperoxidasa	273	Colorante azul de toluidina	283
Negro Sudán B	275	Reacciones citoquímicas y clasificación de las leucemias	284
Fosfatasa alcalina granulocitaria	275		

CITOQUÍMICA ERITROCITARIA

Siderocitos y sideroblastos

Los siderocitos son hematíes que contienen gránulos de hierro no hemo; fueron descritos originalmente por Grüneberg[1] en pequeñas cantidades en la sangre de embriones normales de ratas, ratones y humanos, y en grandes cantidades en ratones con anemia congénita. Los gránulos están formados por un complejo insoluble en agua de ion férrico, lípidos, proteínas e hidratos de carbono. Este material sideróticó (o hemosiderina) reacciona con el ferrocianuro de potasio para formar un compuesto azul: el ferriferrocianuro. Esta reacción es la base de una reacción positiva al azul de Prusia (Perls). El material se tiñe también con los colorantes de Romanowsky, apareciendo entonces como gránulos basófilos, que reciben el nombre de «cuerpos de Pappenheimer» (fig. 13.1)[2]. En contraposición, la ferritina, que es un compuesto soluble en agua del hierro no hemo con la proteína apoferritina, no es detectable con la reacción de Perls. La ferritina se encuentra en todas las células del organismo, mientras que, en los sujetos sanos, la hemosiderina se encuentra principalmente en los macrófagos de la médula ósea, en el hígado (células de Kupffer) y en el bazo; cuando el organismo está sobrecargado de hierro, como en la hemocromatosis o en la hemosiderosis transfusional, dicho hierro en exceso se encuentra también en otros tejidos.

El hierro viaja en plasma unido a una globulina β, la transferrina, y pasa selectivamente a la médula ósea, donde el complejo hierro-transferrina se une a los receptores de la transferrina en la superficie del eritroblasto; el hierro se libera de la transferrina y penetra en la célula. La mayor parte del hierro se convierte rápidamente en hemo: parte en el citosol y parte en las mitocondrias. El residuo no hemo se encuentra en forma de ferritina. La degradación de la ferritina la transforma parcialmente en hemosiderina, que se visualiza bajo el microscopio óptico en forma de partículas refringentes amarillo oro en las células fagocitarias; al teñirse con la reacción de Perls, la hemosiderina se tiñe de color azul.

En los sujetos sanos, los gránulos sideróticos se observan, en las preparaciones teñidas mediante la reacción de Perls, en el citoplasma de muchos de los eritroblastos de la médula ósea humana y en los reticulocitos medulares[3]. Sin embargo, no se observan habitualmente en los hematíes de la sangre periférica humana. Tras la esplenectomía, se pueden encontrar en todo momento siderocitos en sangre periférica, a menudo en grandes cantidades. Probablemente la razón se deba a que los reticulocitos, tras su salida de la médula, son secuestrados normalmente durante un tiempo en el bazo y allí completan la síntesis del hemo, utilizando, para este fin, el hierro almacenado en el interior de los gránulos sideróticos en su citoplasma. Tras la esplenectomía, esta fase de la maduración reticulocitaria tiene que desarrollarse en la corriente sanguínea, pudiendo observarse un pequeño porcentaje de siderocitos en la sangre periférica de personas por lo demás sanas. Probablemente, el bazo sea capaz de eliminar grandes gránulos sideróticos de los hematíes (como los que pueden encontrarse en la enfermedad) por un proceso de extracción[4], y, en su ausencia, tales gránulos persisten en los hematíes durante toda su vida.

Método de tinción de los gránulos sideróticos

Secar al aire las extensiones de sangre periférica o de médula ósea y fijarlas con metanol durante 10-20 min. Cuando estén secas, colocar los portaobjetos en una solución de

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

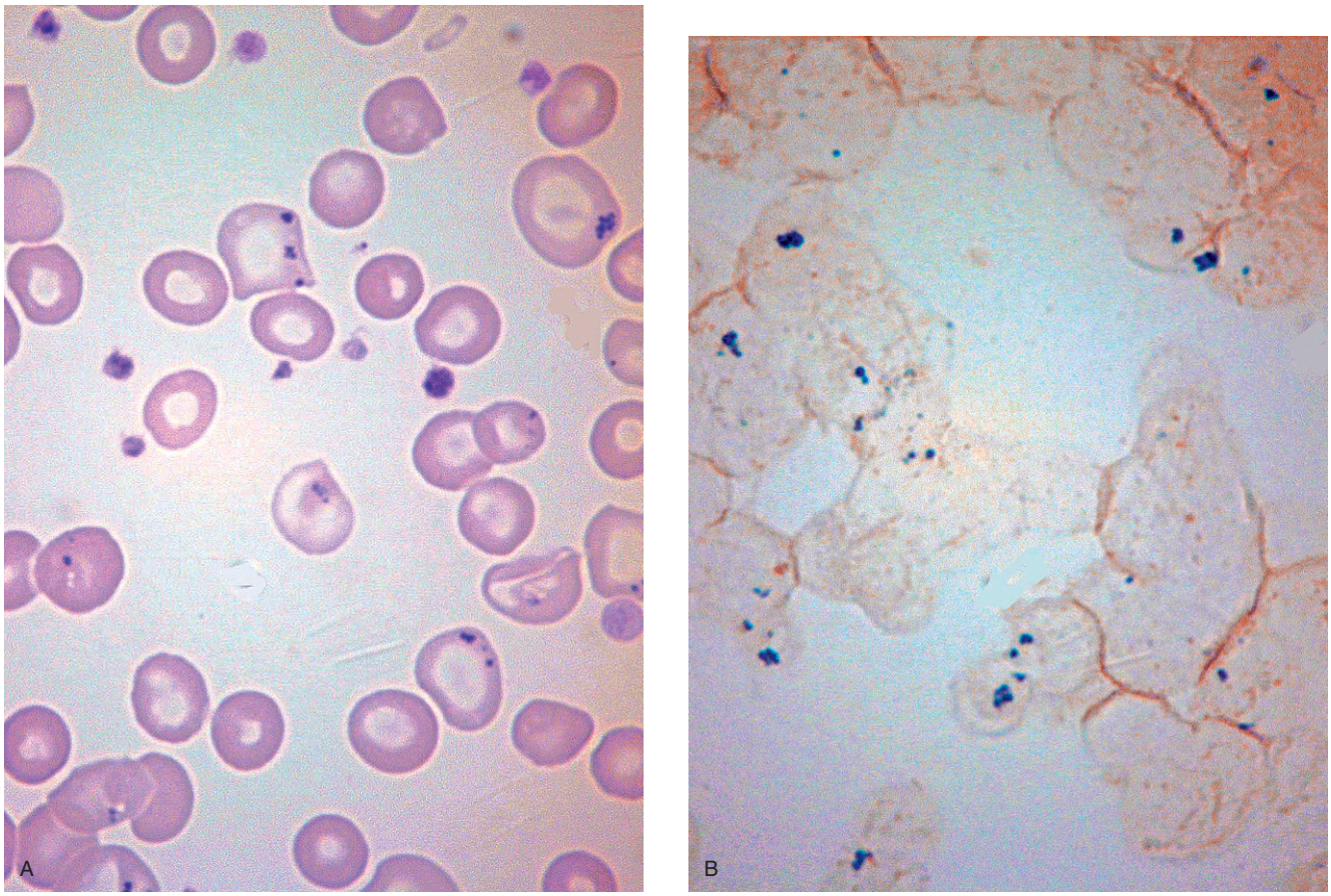


Figura 13.1. Gránulos sideróticos y «cuerpos de Pappenheimer». Microfotografías de hematíes en una extensión de sangre periférica de un paciente con síndrome mielodisplásico (anemia refractaria con sideroblastos en anillos) que ha sufrido una esplenectomía; se observan los cuerpos de Pappenheimer (May-Grünwald–Giemsa) (A) y los gránulos sideróticos (reacción de Perls) (B).

10 g/l de ferrocianuro potásico en 0,1 mol/l de HCl preparado mediante la mezcla de volúmenes iguales de 47 mmol/l (20 g/l) de ferrocianuro potásico y 0,2 mol/l de HCl inmediatamente antes de su utilización.

Dejar los portaobjetos en la solución durante cerca de 10 min a unos 20 °C. Lavar bien durante 20 min con agua del grifo, aclarar minuciosamente en agua destilada y contrateñir con 1 g/l de rojo neutro acuoso o de eosina durante 10-15 s. Hay que tener cuidado para evitar la contaminación con el hierro que pueda haber en los portaobjetos o en los platillos de tinción. Preparar el material de cristal sumergiéndolo en HCl, 3 mol/l, antes de lavarlo (v. pág. 592). Para controlar la calidad, se debe teñir siempre una extensión de médula ósea positiva junto con las extensiones de prueba.

Se pueden teñir con azul de Prusia las extensiones que fueron previamente teñidas con los colorantes de Romanowsky, incluso después de varios años de almacenamiento. Es aconsejable dejar las extensiones en metanol durante toda la noche para eliminar la mayor parte de los colorantes de Romanowsky. Hay que examinar la extensión antes de realizar la reacción de Perls para comprobar que no quede nada de colorante azul residual que pudiera oscurecer la tinción con el azul de Prusia. Sundberg y Bromann describieron una técnica por medio de la cual las extensiones se teñían primero con un colorante de Romanowsky (tinción de Wright) y después se sobreteñían con el método del ferrocianuro ácido[5]. De esta forma se pueden obtener hermosas fotografías, pero los pequeños gránulos que contienen el hierro teñido de azul tienden a enmascararse como eritroblastos jóvenes por la basofilia general del citoplasma celular. Hayhoe y Quaglino describieron un método que combinaba el ácido peryódico de Schiff (PAS) y la tinción de hierro[6]. Dicho método puede ser de utilidad para investigar la eritropoyesis anómala en la que los eritroblastos dan una reacción positiva al PAS (v. pág. 277). Se ha descrito un método rápido para demostrar los gránulos sideróticos mediante la tinción con azul bromoclorofeno al 1% durante 1 min[7]. Los gránulos con contenido férrico se tiñen de púrpura oscuro.

Significado de los siderocitos

Los siderocitos contienen uno o dos gránulos (raramente muchos) con contenido férrico, pequeños y desigualmente distribuidos, que se tiñen con el color azul de Prusia. Hay normalmente unos cuantos gránulos sideróticos muy pe-

queños y repartidos al azar en cerca del 40% de los eritroblastos tardíos[3]. Se tiñen débilmente y pueden ser difíciles de ver con el microscopio óptico. El porcentaje de eritroblastos reconocibles como sideroblastos aumenta en las anemias hemolíticas y en las megaloblásticas así como en las hemocromatosis y en las hemosiderosis, en proporción al grado de saturación de la transferrina (es decir, a la cantidad de hierro disponible). Se produce un incremento desproporcionado en el porcentaje de eritroblastos que son sideroblastos cuando la síntesis de hemoglobina está alterada, en cuyo caso los gránulos sideróticos son más numerosos y mayores de lo normal (fig. 13.2). Cuando hay un defecto en la síntesis del hemo, los gránulos se depositan en las mitocondrias y suelen aparecer dispuestos en círculo alrededor del núcleo (fig. 13.3) formando los característicos «sideroblastos en anillo» de las anemias sideroblásticas. En cambio, la distribución de los gránulos dentro de las células tiende a ser normal en aquellos trastornos en los que sólo hay afectación de la síntesis de la globina (p. ej., en la talasemia) o cuando hay una sobrecarga de hierro.

Hay varios tipos de anemia sideroblástica. Entre ellas se encuentran el tipo congénito (hereditario), el déficit (raro) de piridoxina (vitamina B_6), la anemia sideroblástica causada por antagonistas de la vitamina B_6 (p. ej., los fármacos utilizados en la terapia antituberculosa) y la anemia sideroblástica secundaria al alcoholismo y a la intoxicación por plomo. La presencia de sideroblastos en anillo es una característica definida de la anemia refractaria con sideroblastos en anillo[8] y de la citopenia refractaria con displasia de varias líneas y con sideroblastos en anillo, dos de las categorías de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del síndrome mielodisplásico (SMD). Pueden también presentarse en otras categorías de SMD. Los sideroblastos en anillo no son infrecuentes en otras neoplasias hematológicas, como son la mielofibrosis idiopática y la leucemia mieloide aguda (LMA), sobre todo la eritroleucemia y las categorías de la OMS de la LMA relacionada con el tratamiento y de la LMA con displasia multilínea.

En las neoplasias hematológicas que tienen como característica una anemia sideroblástica, los eritroblastos pueden estar cargados con gránulos sideróticos en todas las etapas de maduración, mientras que en las anemias sideroblásticas secundarias y en los tipos hereditarios, las células más maduras parecen ser las más afectadas.

Además de los gránulos sideróticos dentro de los eritroblastos, en condiciones normales se puede observar hemosiderina en las extensiones medulares en forma de agregados de gránulos pequeños, libres, o bien en el interior de los macrófagos en los grumos medulares[9]. La cantidad de hemosiderina aumenta notablemente en aquellos pacientes con depósitos elevados de hierro, y no se observan en la anemia ferropénica (fig. 13.4). En la práctica, la tinción para poner de manifiesto los depósitos de hierro en los grumos medulares y los gránulos sideróticos en los eritroblastos es un procedimiento diagnóstico sencillo y valioso que debería realizarse en las extensiones medulares de forma rutinaria.

En las infecciones crónicas, y en otros ejemplos de «anemia de las enfermedades crónicas», los depósitos de hierro pueden estar aumentados, con mucho material sideróticos en los macrófagos pero poco o ninguno visible en los eritroblastos. El exceso marcado de hierro en los macrófagos es también una característica de las talasemias intermedia y mayor y de algunas anemias diseritropoyéticas. En cambio, la ausencia de hierro es diagnóstica del

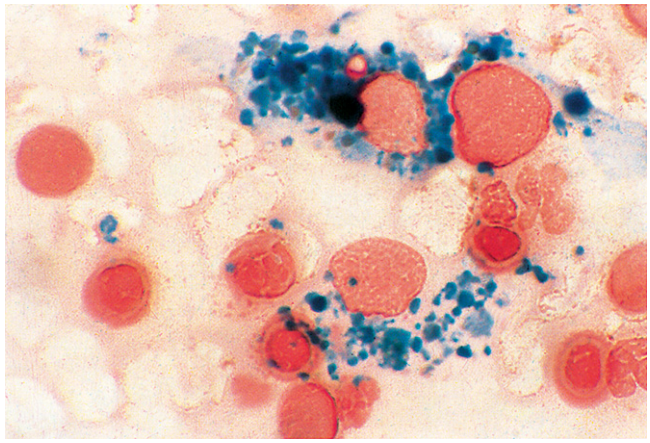


Figura 13.2. Sideroblastos patológicos. Talasemia. Hay una acumulación masiva de gránulos con contenido de hierro en los normoblastos y en las células fagocitarias. Reacción de Perls.

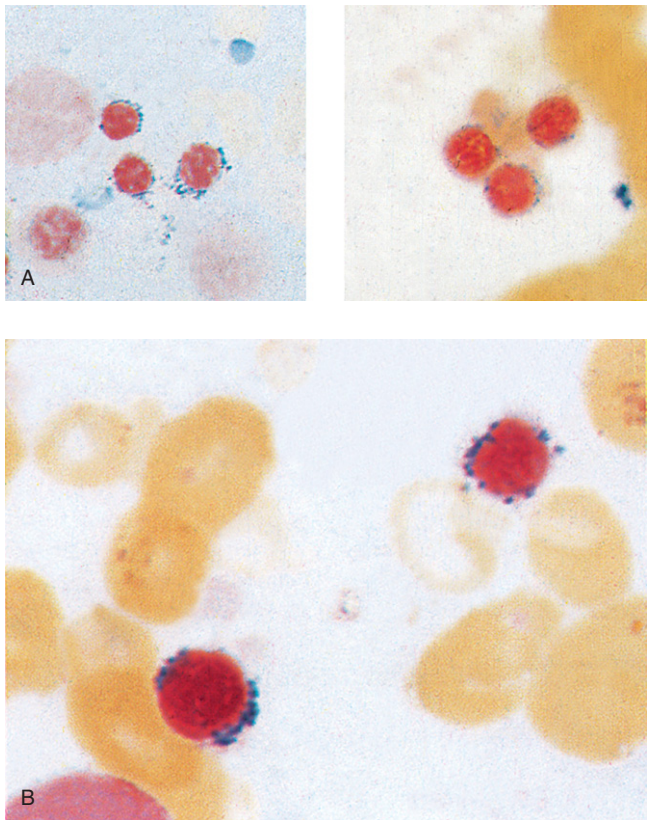


Figura 13.3. Sideroblastos patológicos. Anemias sideroblásticas. Acumulación de gránulos con contenido de hierro en los normoblastos, dispuestos de forma característica alrededor del núcleo. A: tipo hereditario. B: síndrome mielodisplásico. Reacción de Perls.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

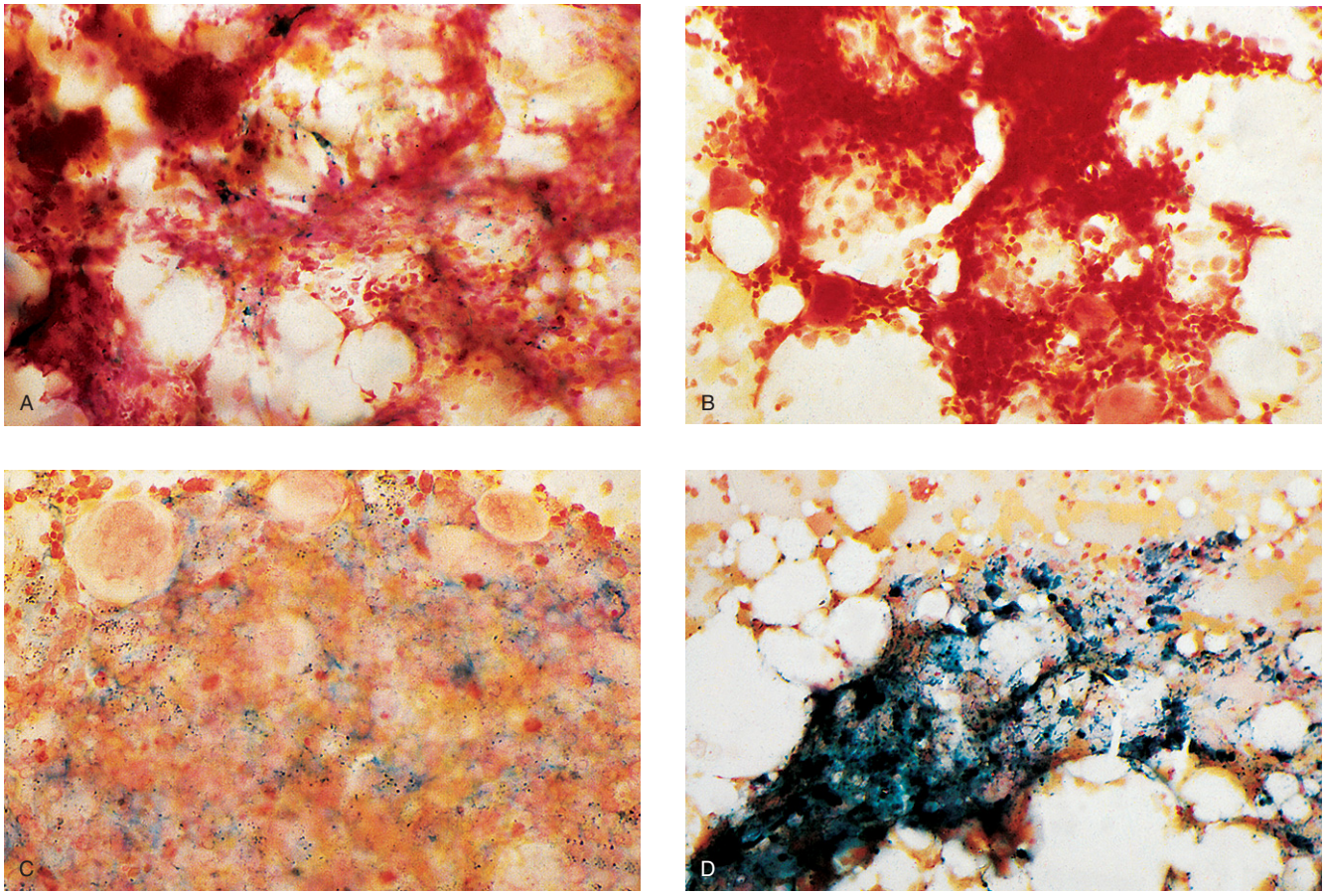


Figura 13.4. Tinción con azul de Prusia (reacción de Perls) de partículas aspiradas de la médula ósea para demostrar los depósitos de hierro. A: normal. B: ausente. C: aumentada. D: muy aumentada.

déficit de hierro o de la depleción de hierro (este último término indica el estado en el cual el hierro de depósito está ausente pero la anemia no se ha manifestado todavía). Un estudio ha demostrado que para establecer la ausencia de hierro tingible, se deben examinar al menos siete grumos y, si es necesario, utilizar más de una extensión con este objetivo[10]. No hay un método citoquímico para demostrar la ferritina; los métodos de análisis se describen en el capítulo 7.

Derivados de la hemoglobina

Cuerpos de Heinz en los hematíes

Heinz en 1890 fue el primero en describir en detalle las inclusiones en los hematíes que se desarrollaban como resultado de la acción de la acetilfenilhidrazina en la sangre[11]. Actualmente se sabe que los cuerpos de Heinz pueden producirse por la acción sobre los hematíes de un amplio rango de compuestos aromáticos nitrogenados y aminados, así como por agentes oxidantes inorgánicos como el clorato potásico. También se producen cuando alguna de las cadenas de globina de la hemoglobina es inestable. En el ser humano, el hallazgo de los cuerpos de Heinz es un signo de intoxicación química, intoxicación farmacológica, déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) o de la presencia de una hemoglobina inestable (p. ej., la Hb Köln). Cuando el origen es químico o farmacológico, es probable que los cuerpos de Heinz sean visibles en los hematíes únicamente si el paciente ha sido esplenectomizado previamente o si se han tomado dosis masivas del producto químico o del fármaco. Cuando se deben a una hemoglobina inestable, son raramente visibles en los hematíes recién extraídos, excepto tras una esplenectomía. No obstante, pueden desarrollarse *in vitro* en la sangre previamente a una esplenectomía si se incuba durante 24-48 h[12]. Los cuerpos de Heinz son un signo tardío del daño oxidativo y representan un producto final de la degradación de la hemoglobina. Entre las revisiones realizadas sobre los cuerpos de Heinz se encuentran las de Jacob[13] y White[14].

Demostración de los cuerpos de Heinz

Preparaciones sin teñir

Los cuerpos de Heinz pueden verse como objetos refringentes en extensiones secas y sin teñir si la iluminación se reduce disminuyendo la intensidad del condensador del microscopio; también pueden verse por iluminación con fondo oscuro o con microscopia de contraste de fases. Sin

embargo, es preferible buscarlos en las preparaciones teñidas (v. más adelante). Su tamaño varía de 1 a 3 µm. En una única célula puede haber uno o más de uno. Habitualmente están próximos a la membrana celular y pueden causar protrusión de la misma; en las preparaciones húmedas, pueden desplazarse dentro de las células con un movimiento browniano lento.

El producto de degradación de una hemoglobina inestable (p. ej., la Hb Köln) presenta una fluorescencia verde al ser excitada por la luz azul a 370 nm en un microscopio de fluorescencia[15].

Preparaciones teñidas

Disolver aproximadamente 0,5 g de violeta de metilo en 100 ml de NaCl, 9 g/l y filtrar. Añadir 1 volumen de sangre (en cualquier anticoagulante) a 4 volúmenes de la solución con violeta de metilo y dejar reposar la solución durante cerca de 10 min a temperatura ambiente. A continuación, preparar las extensiones y dejarlas secar u observar la suspensión de las células entre el portaobjetos y el cubreobjetos. Los cuerpos de Heinz se tiñen de un púrpura intenso (fig. 13.5).

Los cuerpos de Heinz también se tiñen con otros colorantes básicos. El verde brillante los tiñe bien y el colorante no es captado por el resto de los componentes del eritrocito[16]. El azul Rhodanile (solución de 5 g/l en 10 g/l de NaCl) los tiñe rápidamente[17] (es decir, en 2 min); en ese momento los reticulocitos sólo están teñidos débilmente. En comparación con el violeta de metilo, los cuerpos de Heinz se tiñen menos intensamente con el azul de cresil brillante o con el nuevo azul de metileno. Sin embargo, pueden ser vistos inmediatamente como cuerpos azul pálido en una preparación de reticulocitos bien teñida, si no se ha contrateñido la preparación.

Si se necesitan preparaciones permanentes, fijar las extensiones teñidas vitalmente mediante la exposición al vapor de formalina durante 5-10 min. A continuación, contrateñir las extensiones fijadas con 1 g/l de eosina o de rojo neutro, tras lavarlas minuciosamente en agua. Si se fijan las extensiones en metanol, los cuerpos de Heinz se decoloran.

En la talasemia β mayor, la tinción con violeta de metilo de la médula ósea pondrá de manifiesto las cadenas α precipitadas. Aparecen como grandes inclusiones irregulares en los normoblastos tardíos, generalmente únicas y en estrecho contacto con el núcleo. Si se esplenectomiza a estos pacientes, se pueden encontrar las inclusiones en los reticulocitos y en los hematíes maduros.

Demostración de las inclusiones H de la hemoglobina

Los pacientes con talasemia α, que forman hemoglobina H (β_4), presentan hematíes en los que se desarrollan inclusiones esféricas múltiples azul-verdosas al exponerlos al azul de cresil brillante o al nuevo azul de metileno como en las preparaciones de reticulocitos[18] (fig. 13.6). Esta característica corresponde, sobre todo, a la enfermedad de la hemoglobina H, pero se pueden observar pequeñas cantidades de células similares en el rasgo talasémico α, sobre todo, aunque no exclusivamente, en el rasgo talasémico α^0.

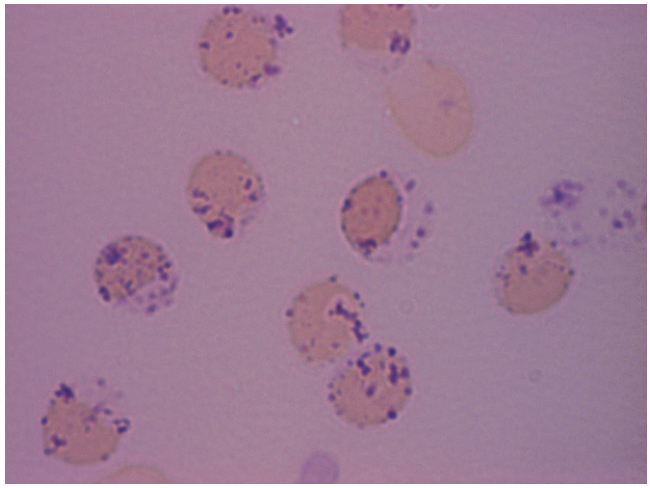


Figura 13.5. Déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Muchas de las células contienen grandes cuerpos de Heinz. Teñidos supravitalmente con el violeta de metilo. (Cortesía de David Roper.)

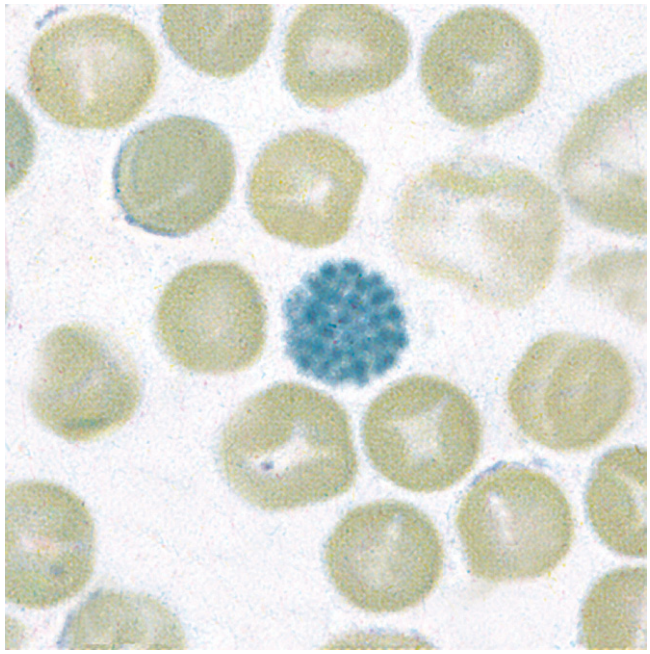


Figura 13.6. Desnaturalización de la Hb H por el azul de cresil brillante. Los cuerpos redondos están formados por Hb H precipitada.

Método

Mezclar conjuntamente en un tubo pequeño, como para la tinción de reticulocitos (v. pág. 34), volúmenes iguales de sangre fresca o de sangre con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y 10 g/l de azul de cresil brillante o 20 g/l de nuevo azul de metileno en tampón fosfato isoosmótico a pH 7,4. Mantener la preparación a 37 °C durante 1-3 h haciendo extensiones a intervalos. Dejar que se sequen las extensiones y examinarlas sin contrateñirlas. La hemoglobina H precipita en forma de cuerpos múltiples, casi esféricos, de diverso tamaño, que se tiñen de un color azul-verdoso pálido (fig. 13.7) y que pueden diferenciarse claramente del

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

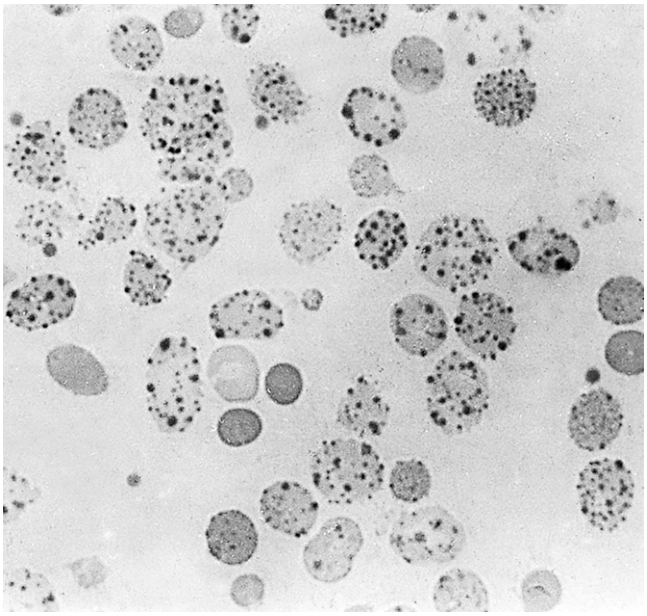


Figura 13.7. Enfermedad de la Hb H. Casi todos los hematíes están afectados.

material reticulofilamentoso, que se tiñe de oscuro, de los reticulocitos (fig. 13.8).

El número de células que contienen inclusiones varía de acuerdo con el tipo de talasemia α. En el rasgo talasémico α^0, sólo el 0,01-1,0% de los hematíes contiene inclusiones, pero este hallazgo proporciona una clave importante para el diagnóstico. Como regla, en la enfermedad de la hemoglobina H (p. ej., la que resulta de la heterocigosidad compuesta talasemia α^0/talasemia α^+, – –/–αα), al menos el 10% de las células desarrollan inclusiones y, en algunos casos, el porcentaje es considerablemente mayor.

Cuando sólo hay unas cuantas células afectadas, su detección será más fácil en una preparación enriquecida[19]. Llenar 2-3 tubos capilares con la sangre y centrifugarlos durante 5 min en una centrífuga de microhematocrito.

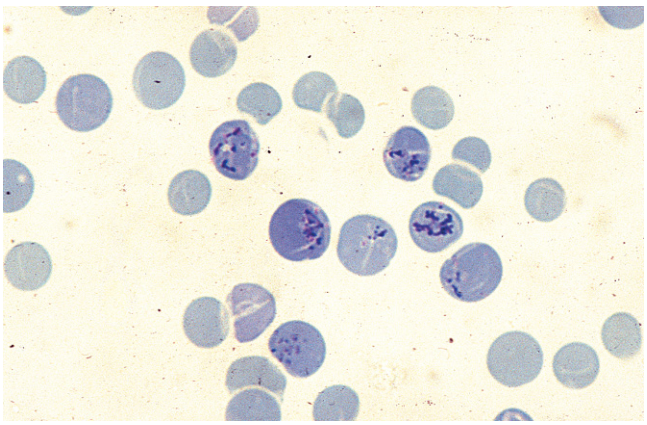


Figura 13.8. Extensión sanguínea de un paciente con esferocitosis hereditaria. El número de reticulocitos está aumentado. Tinción supravital con azul de cresil brillante.

Después, marcar los tubos justo por debajo de la capa de leucocitos y también 1 cm más abajo; romperlos por las marcas indicadas y transferir cuidadosamente los segmentos rotos a un tubo pequeño. Añadir 1 gota de colorante e incubar a 37 °C durante 3 h antes de hacer una extensión.

Hay que recordar que cuando se necesita un diagnóstico preciso del tipo de rasgo talasémico α (p. ej., para el diagnóstico prenatal), no está indicada la preparación de la hemoglobina H. En ese caso lo indicado es el análisis del ADN.

Carboxihemoglobina y metahemoglobina

Las células que contienen carboxihemoglobina y metahemoglobina pueden ponerse de manifiesto por medios citoquímicos. Estos métodos fueron descritos por Kleihauer[20]. Tienen poco valor práctico en la práctica actual.

Hemoglobina fetal

El método citoquímico de elución ácida, introducido por Kleihauer y cols.[21], es un procedimiento sensible para identificar las células individuales que contienen hemoglobina F incluso cuando hay pocas. Su detección en la circulación materna ha proporcionado información valiosa en la patogénesis de la enfermedad hemolítica del recién nacido.

La identificación de las células que contienen hemoglobina F se basa en el hecho de que son resistentes a la elución ácida en mayor grado que las células normales; así, en la técnica descrita a continuación, aparecen como células aisladas, teñidas de oscuro en un trasfondo de células fantasma pálidamente teñidas. Las células ocasionales que se tiñen en un grado intermedio son menos fáciles de evaluar; algunas de ellas pueden ser reticulocitos porque resisten también a la elución ácida en alguna medida. Recomendamos el método siguiente[22], en el que la elución se realiza a pH 1,5.

Reactivos

Fijador. Etanol al 80%.

Solución de elución. Solución A: 7,5 g/l de hematoxilina en etanol al 90%. Solución B: $FeCl_3$, 24 g; 20 ml de HCL, 2,5 mol/l; agua bidestilada hasta 1 l.

Para su utilización, mezclar correctamente 5 vol. de A y 1 vol. de B. El pH es aproximadamente 1,5. La solución puede utilizarse durante alrededor de 4 semanas; si se forma un precipitado, hay que filtrar la solución.

Contratinción. 1 g/l de eritrosina acuosa o 2,5 g/l de eosina acuosa.

Método

Preparar extensiones nuevas secadas al aire. Inmediatamente después de su secado, fijar las extensiones durante 5 min en etanol al 80% en una cubeta de Coplin. A continuación, aclarar las extensiones rápidamente en agua y dejarlas verticalmente sobre un papel secante durante unos 10 min para que se sequen. Después, disponer las extensiones durante 20 s en una cubeta de Coplin con la solución de elución. Posteriormente, lavarlas minuciosamente con agua y, por último, colocarlas para contrateñirlas durante

2 min. Aclarar en agua del grifo y dejarlas secar al aire. Las células fetales se tiñen de rojo y las células fantasma del adulto de rosa pálido (fig. 13.9). Como controles positivo y negativo deben teñirse al lado de las extensiones problema extensiones preparadas a partir de: *a)* una mezcla de sangre del cordón umbilical y de sangre de adulto, y *b)* sangre de adulto normal.

Se han propuesto diversas modificaciones al método de Kleihauer. En una de ellas se incorpora nuevo azul de metileno a la solución tampón, el tiempo de reacción se alarga y el tampón se utiliza para lavar las extensiones[23]. La ventaja de esta técnica es que los reticulocitos se tiñen de azul, mientras que las células que contienen hemoglobina F lo hacen de rosa.

Se ha desarrollado un método de tinción immunofluorescente basado en la utilización de un anticuerpo específico contra la hemoglobina F, que no reacciona con la hemoglobina A[24]. Utilizando un procedimiento de doble marcaje, con anticuerpo marcado con rhodamina contra la globina γ y un anticuerpo marcado con fluoresceína contra la globina β, es posible detectar la presencia de hemoglobina F y de hemoglobina A en la misma célula[25].

Hemoglobina S y otras variantes de la hemoglobina

Se ha utilizado la inmunodifusión con anticuerpos específicos para la identificación de la hemoglobina S, la hemoglobina A_2 y la hemoglobina F en los hematíes[26,27]. Un método alternativo consiste en la detección de las células tras etiquetar éstas con isotiocianato de fluoresceína (FITC)[26]. Mediante un método de doble marcaje, similar al descrito anteriormente, es posible identificar la hemoglobina S así como cualquier otra hemoglobina en las células individuales.

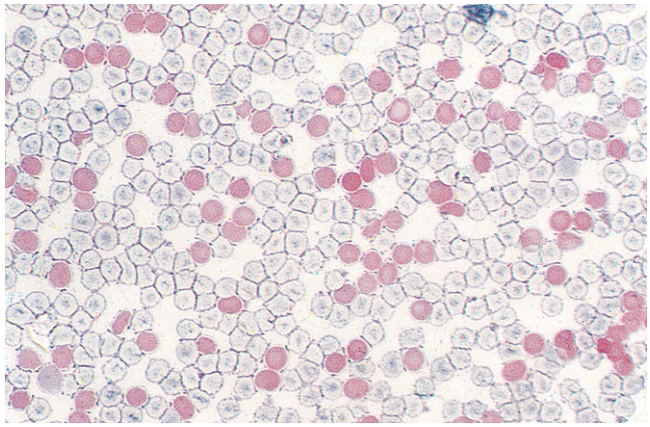


Figura 13.9. Demostración citoquímica de la hemoglobina fetal. Método de elución ácida. La preparación consiste en una mezcla de sangre del cordón umbilical y de adulto normal. Las células teñidas de oscuro son células fetales.

CITOQUÍMICA LEUCOCITARIA

La citoquímica leucocitaria comprende las técnicas utilizadas para identificar de forma diagnóstica las enzimas útiles u otras sustancias en el citoplasma de las células hematopoyéticas. Estas técnicas son particularmente interesantes para la caracterización de las células inmaduras en la LMA y para la identificación de las anomalías de maduración en los síndromes mielodisplásicos y en los trastornos mieloproliferativos. Existen muchas variantes de las técnicas de tinción, como se recoge en las recomendaciones de un panel de expertos del International Committee (ahora Council) for Standardization in Haematology[28,29]. Disponemos de trabajos detallados de referencia que analizan los aspectos teóricos y prácticos de la citoquímica[30]. La utilización de esta última para caracterizar los trastornos linfoproliferativos ha sido ampliamente reemplazada por las técnicas inmunológicas (v. cap. 14). Los resultados de las pruebas citoquímicas hay que interpretarlos siempre en relación con los colorantes de Romanowsky y con las técnicas inmunológicas. Las extensiones de sangre o de médula de control se han de teñir siempre en paralelo para garantizar la calidad de la tinción. Los principales usos de la citoquímica son los siguientes:

1. Tipificar como mieloides las células blásticas en las leucemias agudas.
2. Identificar los componentes granulocíticos y monocíticos de la leucemia mieloide aguda (LMA).
3. Identificar las estirpes poco frecuentes implicadas, de forma ocasional, en los trastornos mieloides clonales (p. ej., los basófilos y los mastocitos).
4. Detectar las anomalías citoplasmáticas y el déficit enzimático en los trastornos mieloides (p. ej., neutrófilos con déficit de mieloperoxidasa en la mielodisplasia o en la leucemia aguda, neutrófilos con déficit de fosfatasa alcalina granulocitaria en la leucemia mieloide crónica [LMC], etc.).

Mieloperoxidasa

La mieloperoxidasa (MPO) se localiza en los gránulos primarios y secundarios de los neutrófilos y de sus precursores, en los gránulos de los eosinófilos y en los gránulos azurófilos de los monocitos. La MPO en los gránulos eosinófilos es resistente al cianuro, mientras que la de los neutrófilos y de los monocitos es sensible al cianuro. La MPO desprende H_2O_2 y en presencia de un donante de electrones cromogénico forma un producto de reacción insoluble. Se han utilizado diversos sustitutos de la bencidina, de los cuales el cromógeno preferido es el 3,3'-diaminobencidina (DAB)[31,32]. El producto de la reacción es estable, insoluble y no difusible. La tinción puede favorecerse sumergiendo las extensiones en sulfato o nitrito de cobre, pero, generalmente, no es necesario para la práctica diagnóstica normal. Las técnicas alternativas no basadas en la bencidina utilizan 4-cloro-1-naftol (4CN)[33] o 3-amino-9-etilcarbazol[34]. El primero da una tinción muy vívida, pero es soluble en algunos medios de soporte y en el aceite de inmersión; el último muestra cierta capacidad de difusión y no se tiñe tan fuertemente como el DAB.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Método con la 3,3'-diaminobencidina

Reactivos

Fijador. Acetona formalina tamponada (AFT) (v. pág. 590).
Sustrato. 3,3'-DAB (Sigma D-8001)[a].
Tampón. Tampón fosfato de Sörensen a pH 7,3 (v. pág. 589).
Peróxido de hidrógeno (H_2O_2, 30% p/v).
Contratinción. Hematoxilina acuosa.

Método

1. Fijar los frotis secados al aire durante 30 s en AFT fría.
2. Aclarar minuciosamente con agua del grifo a baja presión y secar al aire.
3. Incubar durante 10 min en la solución operativa del sustrato. Mezclar completamente 30 mg de DAB en 60 ml de tampón, añadir 120 µl H_2O_2 y mezclar bien.
4. Contrateñir con hematoxilina durante 1-5 min, aclarar minuciosamente bajo un chorro de agua del grifo y secar al aire.

Consideraciones técnicas

La MPO no es inhibida por anticoagulantes tales como la heparina, el oxalato o el EDTA. Las extensiones deben hacerse antes de las 12 h de la extracción de la sangre. La tinción resulta satisfactoria en extensiones mantenidas a temperatura ambiente durante hasta una semana. La DAB debe almacenarse congelada a –20 °C en partes alícuotas de 1 ml, formadas por 30 mg en 1 ml de tampón. Para obtener resultados óptimos, es esencial disolver la DAB completamente en el tampón y confirmar que los reactivos en la mezcla de incubación están bien mezclados. La tinción es estable y no depende estrictamente del pH, obteniéndose idénticos resultados cuando se utilizan tampones con pH de 7,0 a 9,0. El tiempo de contratinción ha de ajustarse al tiempo mínimo necesario para obtener un detalle claro de los núcleos. El verde metilo es un contracolorante alternativo, que da un contraste excelente con el producto de reacción de la DAB, aunque resulta más difícil discernir el detalle de los núcleos.

Resultados e interpretación

El producto de reacción es de color marrón y granular (fig. 13.10A). Los hematíes y los precursores eritroides muestran una tinción citoplasmática difusa de color marrón. Los mieloblastos más primitivos son negativos, con una positividad granular que aparece progresivamente a medida que maduran hacia la etapa de promielocito. La positividad puede localizarse en la región de Golgi. Los promielocitos y los mielocitos son las células que más intensamente se tiñen en la serie granulocítica, presentando un citoplasma atestado de gránulos positivos (primarios). Los metamielocitos y los neutrófilos presentan de forma progresiva menos gránulos positivos (secundarios). Los gránulos eosinófilos se tiñen intensamente, distinguiéndose con facilidad los gránulos eosinófilos, grandes y específicos, de los gránulos neutrófilos. La peroxidasa de los gránulos eosinófilos es distinta, tanto bioquímica como inmunológicamente, de la peroxidasa de los neutrófilos. Los monoblastos y los monocitos pueden ser negativos o positivos. Cuando son positivos, los gránulos son más pequeños que en los neutrófilos y están esparcidos de forma difusa por todo el citoplasma. La actividad MPO está presente en los gránu-

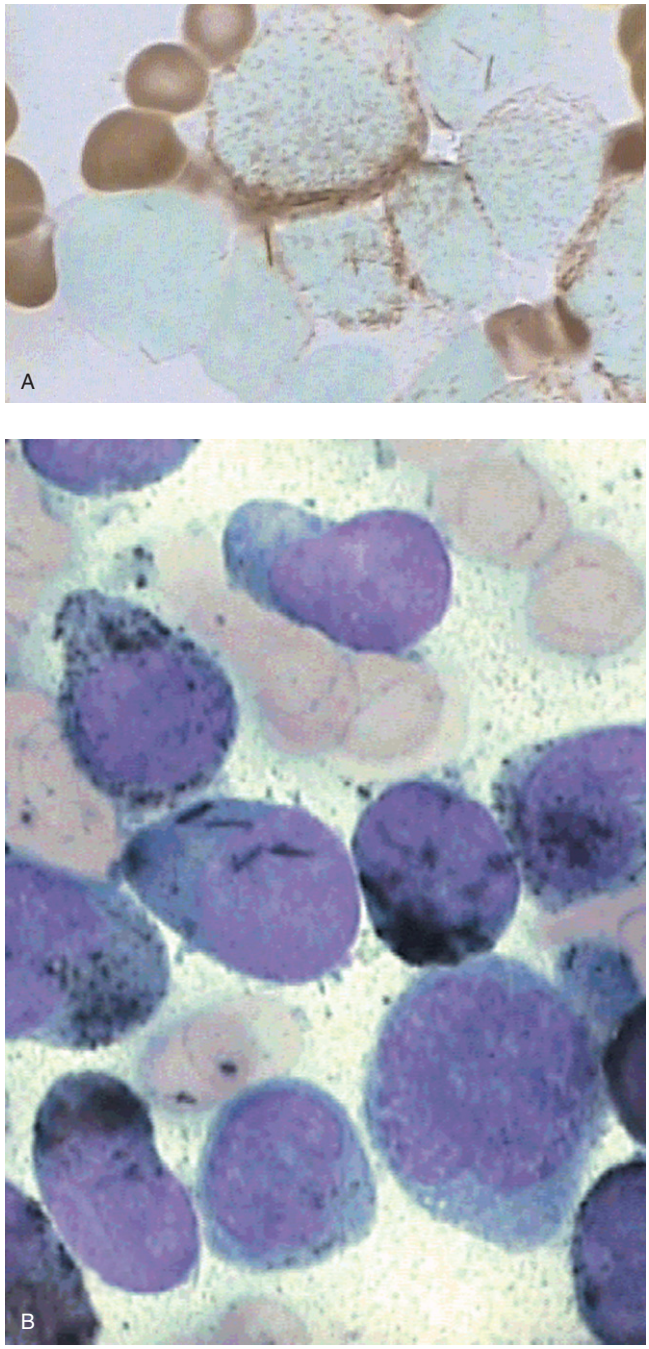


Figura 13.10. A: mieloperoxidasa (MPO). B: negro Sudán B (NSB). Médula ósea en la leucemia mieloide aguda (FAB M1). La tinción con mieloperoxidasa muestra bastones de Auer y tinción granular citoplasmática, mientras que la reacción positiva localizada con NSB en las células blásticas es más definida y los bastones de Auer son prominentes.

[a] Este y el resto de los productos Sigma se obtienen de Sigma-Aldrich.

los basófilos, pero no se puede demostrar en los basófilos maduros mediante la reacción de la DAB descrita anteriormente.

Variaciones patológicas

Algunos escasos individuos tienen una deficiencia congénita de la MPO de los neutrófilos. Todos los estadios de la estirpe neutrófila, a partir del mieloblasto, son negativos. En estos individuos, los eosinófilos se tiñen normalmente. Otros individuos tienen un déficit de MPO limitado a los eosinófilos o a los monocitos. Los neutrófilos displásicos pueden ser MPO negativos. Los bastones de Auer se tiñen bien con la DAB y se observan más frecuentemente en la tinción de la MPO que en las extensiones teñidas con los colorantes de Romanowsky.

Negro Sudán B

El negro Sudán B (NSB) es un colorante lipófilo que se une de forma irreversible a un componente granular indefinido en los granulocitos, en los eosinófilos y en algunos monocitos. No puede extraerse de los gránulos teñidos utilizando disolventes orgánicos y da una información comparable a la de la tinción de la MPO[35]. La solución de tinción actualmente utilizada es básicamente la descrita por Sheehan y Storey[36].

Reactivos

Fijador. Solución de formaldehído al 40%.

Colorante. NSB (Sigma n.º S 2380) 0,3 g en 100 ml de etanol absoluto.

Tampón fenol. Disolver 16 g de fenol cristalino en 30 ml de etanol absoluto. Añadirlo a 100 ml de agua destilada en la que se hayan disuelto 0,3 g de $Na_2HPO_4.12H_2O_2$.

Solución de tinción operativa. Añadir 40 ml de tampón a 60 ml de solución NSB.

Contratinción. Colorante de May-Grünwald-Giemsa o de Leishman (v. pág. 55).

Método

1. Fijar los frotis secados al aire con vapor de formalina de la siguiente forma. Colocar un pequeño cuadrado de papel filtro en el fondo de una cubeta de Coplin. Añadir 2 gotas de formalina al 40%, poner la tapa y dejarla durante 15 min. Colocar las extensiones en la cubeta de Coplin y volver a poner la tapa. A los 5-10 min, retirar las extensiones y dejarlas de lado durante 15 min para que se «ventilen».
2. Sumergir las extensiones en la solución de tinción operativa durante 1 h en una cubeta de Coplin con la tapa puesta.
3. Transferir las extensiones a una gradilla de tinción y anegarla inmediatamente con alcohol al 70%. Después de 30 s, volcarla para tirar el alcohol al 70% y anegarla de nuevo durante 30 s. Repetir tres veces en total.
4. Aclarar con agua del grifo a baja presión y secar al aire.
5. Contrateñir sin más fijación con el colorante de Leishman o con May-Grünwald-Giemsa.

Consideraciones técnicas

La fijación con acetona formalina tamponada durante 30 s es una alternativa satisfactoria al vapor de formalina. La solución de tinción operativa debe sustituirse tras 4 semanas. Los frotis de médula ósea con espículas grasas con NSB soluble en lípidos mejoran si se sumergen, dando vueltas, durante 5 s en xileno, y a continuación se les practica un aclarado con agua del grifo corriente y se secan al aire antes de la contratinción. La contratinción con Romanowsky da excelentes detalles citológicos de todas las células presentes.

Resultados e interpretación

El producto de reacción es negro y granular. Los resultados son esencialmente similares a los observados con la tinción de la MPO, tanto en las células leucémicas como en las normales (figs. 13.10B y 13.15B). Los neutrófilos MPO-negativos son también NSB-negativos. La única diferencia notable reside en los gránulos eosinófilos, que tienen un núcleo claro al teñirse con NSB. Los raros casos (1-2%) de leucemia linfoblástica aguda (LLA) muestran una positividad borrosa no granular que no se observa con la tinción de la MPO[37]. Los basófilos no son, en general, positivos pero pueden mostrar una tinción metacromática rojo/púrpura brillante de los gránulos.

Fosfatasa alcalina granulocitaria

La actividad fosfatasa alcalina se encuentra fundamentalmente en los neutrófilos maduros, con algo de actividad en los metamielocitos. Aunque se ha puesto de manifiesto como un producto de reacción granular en el citoplasma, la actividad de la enzima se asocia con un componente membranoso intracitoplasmático escasamente caracterizado y diferente de los gránulos primarios o secundarios[38]. Los demás leucocitos suelen ser negativos, aunque raros casos de neoplasias malignas linfoides muestran una actividad demostrable por citoquímica[39]. Los macrófagos de la médula ósea son positivos. Los métodos iniciales para demostrar la fosfatasa alcalina se basaban en la utilización de glicerofosfato o de otros fosfomonoésteres como sustrato a pH alcalino, con sulfuro de plomo como producto negro de reacción final[40]. Las técnicas con azocolorantes son más sencillas y dan resultados igualmente buenos. Estos métodos utilizan naftoles sustituidos como sustrato y es el naftol liberado, más que el fosfato, el que se utiliza para combinarse con el azocolorante y dar el producto de reacción final[41-43].

Reactivos

Fijador. Metanol formalina al 4%. Añadir 10 ml de formalina al 40% a 90 ml de metanol. Conservar a –20 °C o en el congelador de un frigorífico. Desechar a las 2 semanas.

Sustrato. Naftol AS fosfato (Sigma N-5625). Conservar en el congelador.

Tampón. Tampón Tris 0,2 mol/l a pH 9,0 (v. pág. 589).

Solución madre de depósito. Disolver 30 mg de naftol AS

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

fosfato en 0,5 ml de N,N-dimetilformamida (Sigma D-4551). Añadir 100 ml de tampón Tris, 0,2 mol/l, a pH 9,1. Almacenar en un frigorífico a 2-4 °C. La solución es estable durante varios meses.

Azocolorante de acoplamiento. Sal de azul rápido BB (Sigma F-0250). Conservar en el congelador.

Contratinción. Rojo neutro en solución acuosa al 0,02%.

Método

1. Fijar las extensiones sanguíneas recién hechas y secadas al aire durante 30 s en metanol formalina al 4% frío.
2. Aclarar con agua del grifo y secar al aire.
3. Preparar una solución de sustrato operativa dejando que 40 ml de la solución de sustrato de depósito alcancen la temperatura ambiente. Añadir 24 mg de azul rápido BB y mezclar minuciosamente hasta que se disuelva. Incubar las extensiones durante 15 min.
4. Aclarar con agua del grifo y secar al aire.
5. Contrateñir durante 3 min en rojo neutro acuoso al 0,02%, aclarar brevemente y secar al aire.

Consideraciones técnicas

La N,N-dimetilformamida puede disolver algunos tipos de plástico; por tanto, se debe utilizar un tubo de vidrio para disolver el sustrato. Hay que realizar las extensiones sanguíneas al poco tiempo de la extracción de la sangre, preferiblemente antes de los 30 min, porque la actividad de la fosfatasa alcalina de los neutrófilos (granulocitos) (FAG) disminuye rápidamente en la sangre anticoagulada con EDTA. La extensión sanguínea, una vez realizada, se debe teñir antes de las 6 h. Las extensiones de control con un índice previsiblemente alto (v. más adelante), por ejemplo, de un paciente con una neutrofilia reactiva o de una mujer embarazada, deben hacerse también, si es posible, a partir de muestras de sangre fresca. Kaplow[44] ha analizado los aspectos técnicos de la preparación de la extensión sanguínea así como los efectos de la fijación sobre la actividad de la FAG. El intervalo de normalidad para los adultos sanos debe establecerse en cada laboratorio individual utilizando una técnica de tinción estándar y unos criterios coherentes de valoración (v. más adelante).

Resultados e interpretación

El producto de reacción es azul y granular. La intensidad del producto de reacción en los neutrófilos varía desde negativo a fuertemente positivo, con gránulos toscos rellenando el citoplasma y superponiéndose al núcleo (fig. 13.11). El índice general se obtiene sumando la intensidad de la tinción de 100 neutrófilos consecutivos, valorando cada neutrófilo en una escala de 1-4 de la siguiente forma:

0 Negativo, sin gránulos.
1 Gránulos ocasionales dispersos por el citoplasma.
2 Cantidad moderada de gránulos.
3 Gránulos numerosos.
4 Fuerte positividad con numerosos gránulos toscos atestando el citoplasma y superponiéndose frecuentemente con el núcleo.

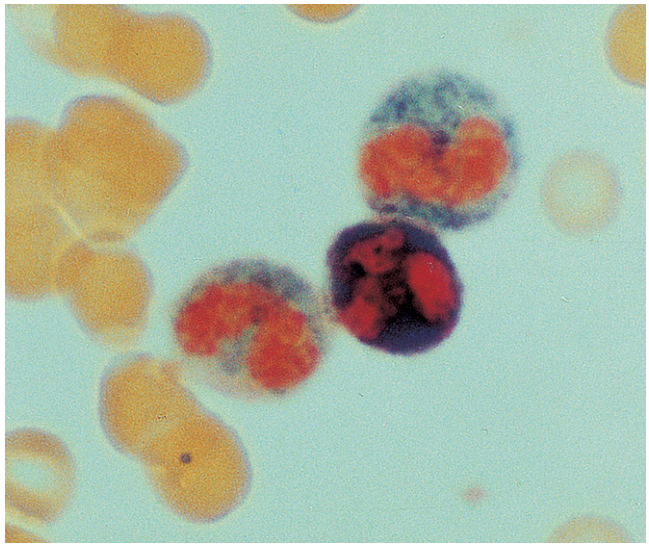


Figura 13.11. Fosfatasa alcalina granulocitaria. Se muestran intensidades de reacción fuertemente positiva (4+) y moderadamente positiva (3+ y 2+).

El índice global posible oscilará entre 0 y 400 por 100 células. Los intervalos normales notificados presentan algunas variaciones, debidas posiblemente en parte a diferencias en los criterios de valoración y en la metodología: 13-160 (media 61)[44]; 14-100 (media 46)[45]; 37-98 (media 68)[46], y 11-134 (media 48)[47]. Por tanto, cada laboratorio debe establecer su intervalo de normalidad.

En individuos normales es muy raro encontrar neutrófilos con una puntuación de 3 y no debe haber ninguno con 4. Hay alguna diferencia fisiológica en el índice de la FAG. Los recién nacidos, los niños y las mujeres embarazadas tienen valores elevados y las mujeres premenopáusicas tienen, como media, valores que son un tercio superiores a los de los hombres[38]. En las situaciones patológicas, la utilización diagnóstica más importante del índice de la FAG es en la LMC. En la fase crónica de la enfermedad, el índice es casi invariablemente bajo, por lo general cero. Puede haber incrementos transitorios en las infecciones intercurrentes. En la transformación mieloide de los blastos o fase acelerada, el índice aumenta. También se encuentran habitualmente índices bajos en la hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) y en el trastorno, extremadamente raro, de la hipofosfatasia hereditaria. Hay muchas causas por las que la FAG se eleva, sobre todo en la neutrofilia de la infección, la policitemia vera, las reacciones leucemioides y la enfermedad de Hodgkin. En la anemia aplásica, el índice de la FAG aumenta, pero desciende si sobreviene una HPN. Con el mayor uso de las técnicas citogenéticas y genéticas moleculares para confirmar el diagnóstico de la LMC, la valoración de la FAG es mucho menos necesaria.

Reacción de la fosfatasa ácida

La fosfatasa ácida citoquímicamente demostrable es ubicua en las células hemopoyéticas. La intensidad de la tinción

de los distintos tipos celulares varía según el método utilizado. Su principal utilización consiste en el diagnóstico de la LLA de los linfocitos T y de la leucemia de células peludas o tricoleucemia[48,49]. Estas enfermedades se identifican y diagnostican de forma más fiable por inmunofenotipado cuando se dispone de esta técnica (v. cap. 14). En la actualidad, la tinción de la fosfatasa ácida no modificada es bastante redundante, aunque la tinción de la fosfatasa ácida resistente al tartrato es aún útil para confirmar el diagnóstico de la leucemia de células peludas cuando no se dispone del inmunofenotipado. Recomendamos el método de la pararosanilina dado en la siguiente sección, adaptado de Goldberg y Barka[50], para demostrar la positividad de las células linfoides T. Para demostrar la actividad de la fosfatasa ácida resistente al tartrato se puede preferir la utilización de Fast Garnet GBC como reactivo de acoplamiento[28,49].

Reactivos

Fijador. Metanol, 10 ml; acetona, 60 ml; agua, 30 ml, y ácido cítrico, 0,63 g. Ajustar el pH a 5,4 con NaOH, 1 mol/l antes de utilizarlo.

Tampón a pH 5,0. Acetato sódico trihidrato, 19,5 g; barbiturato sódico, 29,5 g; agua hasta 1 l (tampón acetato veronal de Michaeli).

Solución de sustrato. 25 mg de naftol AS-BI fosfato (Sigma N 2125) disuelto en 2,5 ml de N,N-dimetilformamida.

Nitrito sódico. Solución acuosa de $NaNO_2$ al 4%.

Reactivo de acoplamiento.

1. Pararosanilina de depósito. Disolver 1 g de pararosanilina (Sigma n.º P-7632) en 25 ml de HCl caliente, 2 mol/l. Filtrarlo cuando se enfríe. Almacenar a temperatura ambiente en la oscuridad. Se conserva estable durante 2 meses.
2. Solución de nitrito sódico al 4%. Disolver 200 mg de nitrito sódico en 5 ml de agua destilada. Es estable durante 1 semana a 4-10 °C.
3. Pararosanilina hexazotada. Mezclar volúmenes iguales de pararosanilina y nitrito sódico al 4% durante 2 min antes de su utilización.

Contratinción. Verde metilo acuoso o hematoxilina acuosa al 1%.

Ácido tartárico L(+) (Sigma T1807).

Solución operativa A. Mezclar 92,5 ml de tampón con 2,5 ml de la solución de sustrato. Añadir 32,5 ml de agua destilada y a continuación 4 ml de pararosanilina hexazotada. Mezclarlas bien y ajustar el pH a 5,0 utilizando NaOH, 1 mol/l.

Solución operativa B. Añadir 375 mg de ácido tartárico L(+) cristalino a 50 ml de solución operativa A; la concentración final será de 50 mmol/l.

Método

1. Secar las extensiones al aire durante varias horas (a ser posible, 24 h).
2. Fijarlas durante 10 min en metanol/acetona/ácido cítrico, aclarar con agua del grifo y secar al aire.
3. Incubar durante 1 h a 37 °C en las soluciones operativas A (reacción de la fosfatasa ácida) o incubar 2 extensiones en las soluciones operativas A y B, respectivamente (reacción de la fosfatasa ácida resistente al tartrato).
4. Aclarar con agua del grifo y secar al aire.
5. Contrateñir en verde metilo acuoso o hematoxilina acuosa al 1% durante 5 min.
6. Aclarar con agua del grifo y montarlas, así humedecidas, en gel de glicerina caliente.

Resultados e interpretación

El producto de la reacción es rojo con una mezcla de positividad granular y difusa (fig. 13.12). En los linfocitos T, la fosfatasa ácida es una característica diferenciadora precoz. Casi todas las leucemias de la estirpe T, tanto agudas como crónicas, muestran una fuerte actividad de la misma. En todas las LLA de la estirpe T, la actividad suele estar muy localizada (polar). Los granulocitos son fuertemente positivos. Los monocitos, los eosinófilos y las plaquetas presentan una positividad variable. En la médula ósea, los macrófagos, las células plasmáticas y los megacariocitos son fuertemente positivos.

En la leucemia de células peludas la mayoría de las células leucémicas reaccionan positivamente tanto en presencia como en ausencia del ácido tartárico (fig. 13.13).

Cuando se dispone de inmunofenotipado, la reacción de la fosfatasa ácida no modificada es redundante. También es redundante si se dispone de un panel completo de anticuerpos monoclonales adecuados.

Reacción del ácido peryódico de Schiff

El ácido peryódico oxida de forma específica los grupos glicol 1-2 para producir dialdehídos estables. Estos dialdehídos dan un producto de reacción rojo al exponerlos al reactivo de Schiff (fucsina leucobásica). Las reacciones positivas se producen con los hidratos de carbono, sobre

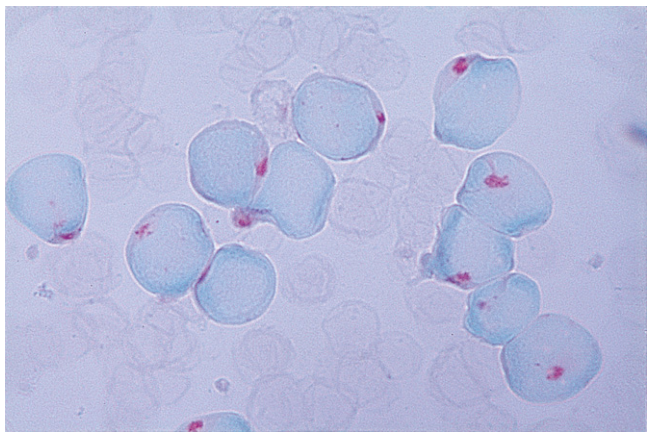
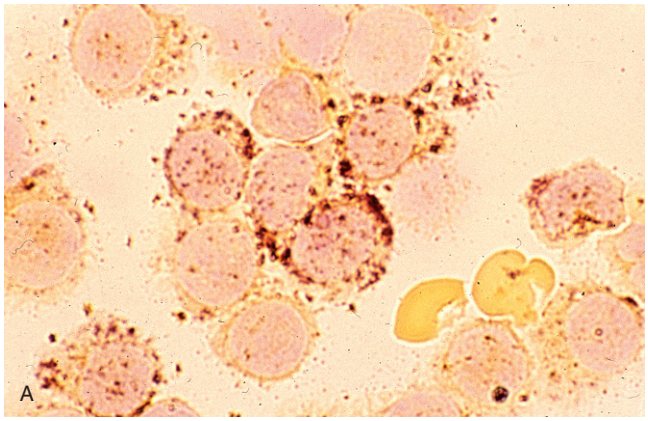


Figura 13.12. Fosfatasa ácida. Leucemia aguda de células T con intensa tinción localizada.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.



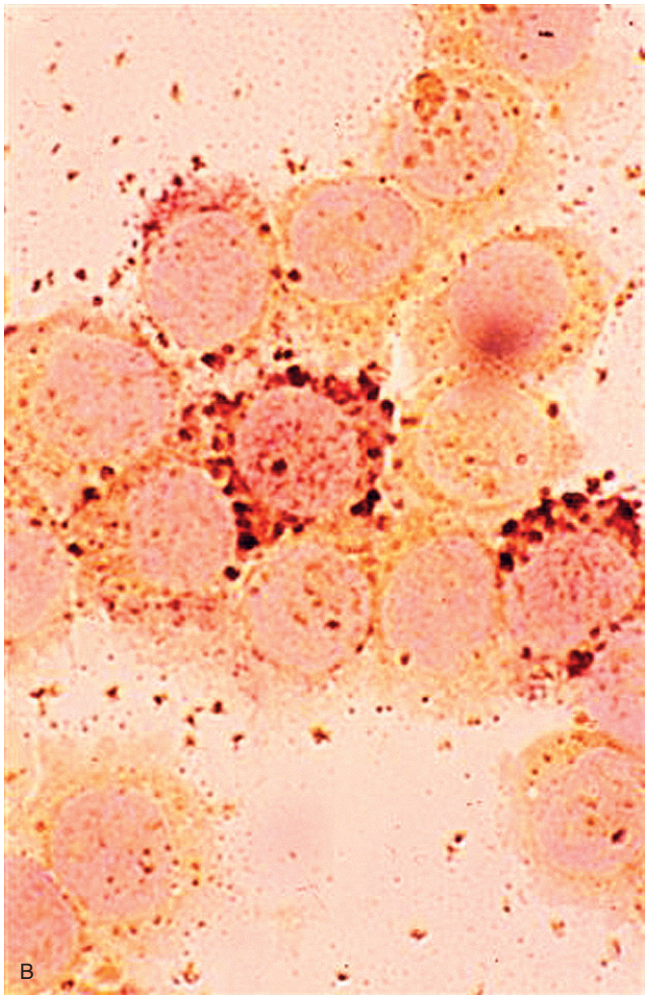


Figura 13.13. Fosfatasa ácida. Fosfatasa ácida en la leucemia de células peludas (A) y fosfatasa ácida resistente al tartrato (B).

todo el glucógeno, pero también con los monosacáridos, polisacáridos, glucoproteínas, mucoproteínas, azúcares fosforilados, derivados del inositol y cerebrósidos[51]. Se puede diferenciar el glucógeno de otras sustancias con reacción positiva por su sensibilidad a la digestión por las diastasas. En células hemopoyéticas, la principal causa de reacciones positivas es el glucógeno.

Reactivos

Fijador. Metanol.

Ácido peryódico al 1%. 10 g/l de $HIO_4.2H_2O$ en agua destilada.

Reactivo de Schiff. Disolver 5 g de fucsina básica en 500 ml de agua destilada caliente. Filtrar cuando se enfríe. Saturar con gas SO_2 mediante burbujeo durante 1-12 h en una campana de extracción. Agitar vigorosamente con 2 g de carbón activado durante 1 min en un matraz de Erlenmeyer en el interior de la campana de extracción y decantarlo inmediatamente a través de un filtro grande Whatman del n.º 1 en una botella oscura. El reactivo es estable durante 6 meses a temperatura ambiente, almacenado en la oscuridad.

Contratinción. Hematoxilina acuosa.

Método

1. Fijar las extensiones durante 15 min en metanol.
2. Aclarar con agua del grifo a baja presión y secar al aire.
3. Si es necesario, exponer las extensiones de control fijadas a la digestión por la diastasa (100 mg en 100 ml de NaCl, 0,9 g/l) durante 20-60 min a temperatura ambiente.
4. Sumergir las extensiones en ácido peryódico al 1% durante 10 min.
5. Aclarar con agua del grifo a baja presión durante 10 min y secar al aire.
6. Sumergir en el reactivo de Schiff durante 30 min en una cubeta de Coplin con tapa (el reactivo de Schiff puede devolverse a la botella de depósito).
7. Aclarar con agua del grifo a baja presión durante 10 min y secar al aire.
8. Contrateñir con hematoxilina acuosa durante 5-10 min.

Consideraciones técnicas

El vapor de formalina (5 min), la formalina/etanol (10 ml de formalina al 40%/90 ml de etanol) (10 min) o la acetona formalina tamponada (45 s) son fijadores alternativos adecuados. Los frotis teñidos con Romanowsky o con tinción para hierro, fijados previamente, pueden sobreteñirse con la reacción de PAS de forma satisfactoria. Los frotis teñidos con Romanowsky se pueden decolorar parcialmente sumergiéndolos en metanol durante 1 h antes del paso 4. La intensidad del producto de la reacción depende de la calidad del reactivo de Schiff. Los neutrófilos normales deben teñirse siempre de rojo intenso y el deterioro del reactivo de Schiff puede detectarse mediante el examen de las extensiones de control normales. Algunos métodos recomiendan aclarar en una solución de HCl metabisulfito de sodio diluido («agua con SO_2») después del paso 6, pero no es necesario cuando se utilizan reactivos de Schiff de buena calidad.

Resultados e interpretación

El producto de reacción es rojo con una intensidad que varía del rosado al rojo brillante (figs. 13.14 y 13.15). La positividad citoplasmática puede ser difusa o granular. Los precursores de los granulocitos muestran una positividad

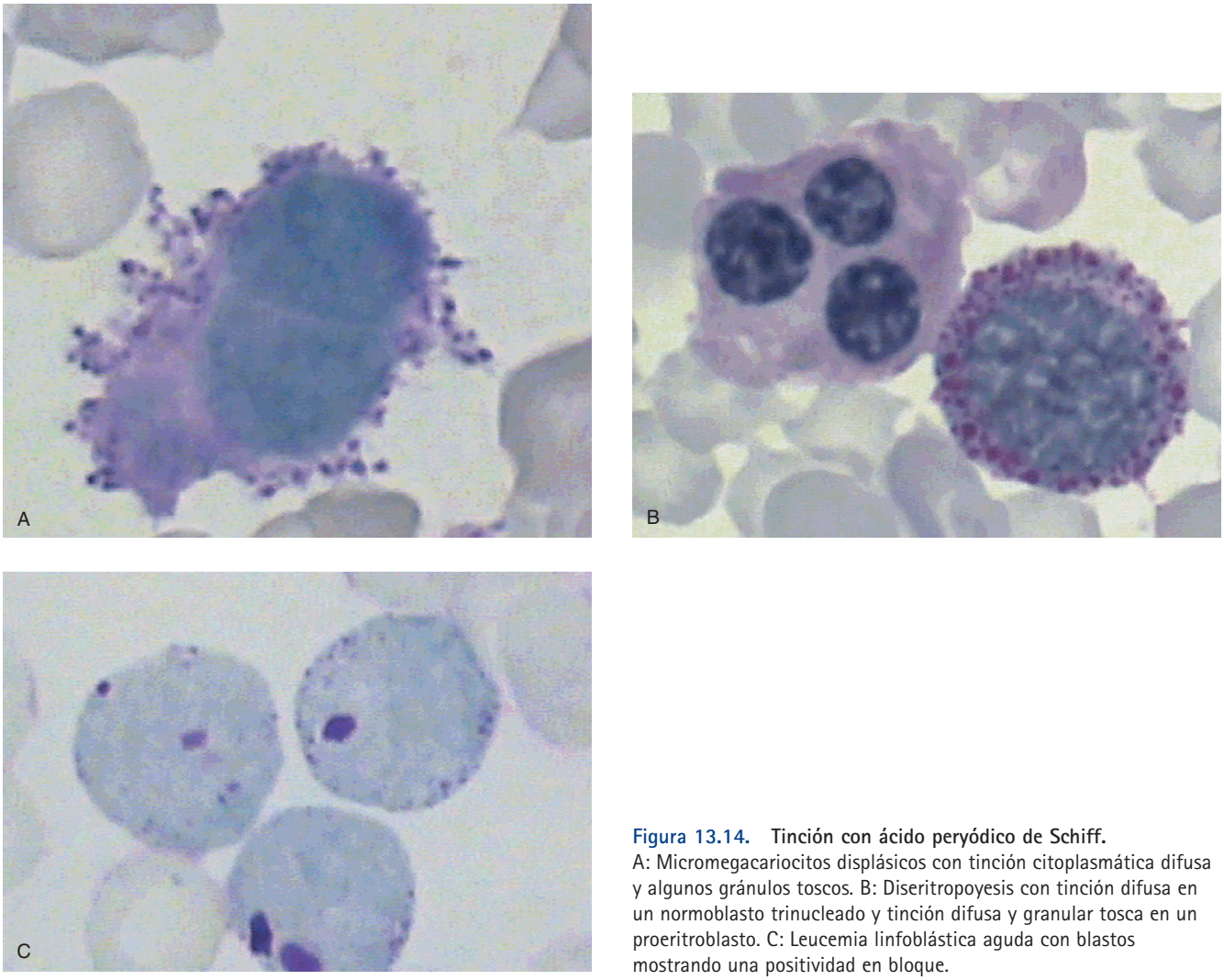


Figura 13.14. Tinción con ácido peryódico de Schiff.
A: Micromegacariocitos displásicos con tinción citoplasmática difusa y algunos gránulos toscos. B: Diseritropoyesis con tinción difusa en un normoblasto trinucleado y tinción difusa y granular tosca en un proeritroblasto. C: Leucemia linfoblástica aguda con blastos mostrando una positividad en bloque.

difusa y débil, mostrando los neutrófilos una intensa positividad granular confluente. Los gránulos de los eosinófilos son negativos, con positividad citoplasmática difusa. Los basófilos pueden ser negativos pero a menudo muestran grandes bloques irregulares de material positivo sin relación con los gránulos. Los monocitos y sus precursores muestran una positividad difusa variable con superposición de gránulos finos, a menudo en la periferia del citoplasma. Los precursores eritroides normales y los hematíes son negativos. Los megacariocitos y las plaquetas muestran una positividad difusa variable, habitualmente intensa, con superposición de gránulos finos, gránulos toscos y bloques grandes. Entre los linfocitos periféricos, el 10-40% muestran una positividad granular con fondo citoplasmático negativo, sin diferencias detectables entre los linfocitos T y los B[52,53]. Cuando se dispone de inmunofenotipado, la reacción del PAS es redundante para el diagnóstico de LLA. Puede tener aún su utilidad en la LMA y en los SMD para identificar los eritroblastos anómalos y los megacariocitos displásicos y poner de manifiesto la nebulosa citoplasmática que ayuda a confirmar el diagnóstico de leucemia promielocítica aguda.

Esterasas

Las esterasas de los leucocitos son un grupo de enzimas que hidrolizan los ésteres acil o acilcloro del α-naftol o del naftol AS. Li y cols.[54] identificaron nueve isoenzimas de la esterasa utilizando la electroforesis en gel de poliacrilamida en extractos leucocitarios de células patológicas y normales. Los geles se tiñeron en paralelo con los frotis celulares. Las isoenzimas se clasificaron en dos grupos: las bandas 1, 2, 7, 8 y 9 correspondían a la esterasa «específica» de los neutrófilos, que se teñían específicamente con naftol AS-D cloroacetato esterasa (CAE), mientras que las bandas 3, 4, 5 y 6 se correspondían con una esterasa «no específica» (ENE), que se teñían con α-naftil acetato esterasa (ANAE) y con α- naftil butirato esterasa (butiratoesterasa, ANBE). La banda 4 se demostró mejor con la ANBE y la banda 5 con la ANAE. Las ENE se inhiben con el fluoruro sódico (NaF). El acetato de

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

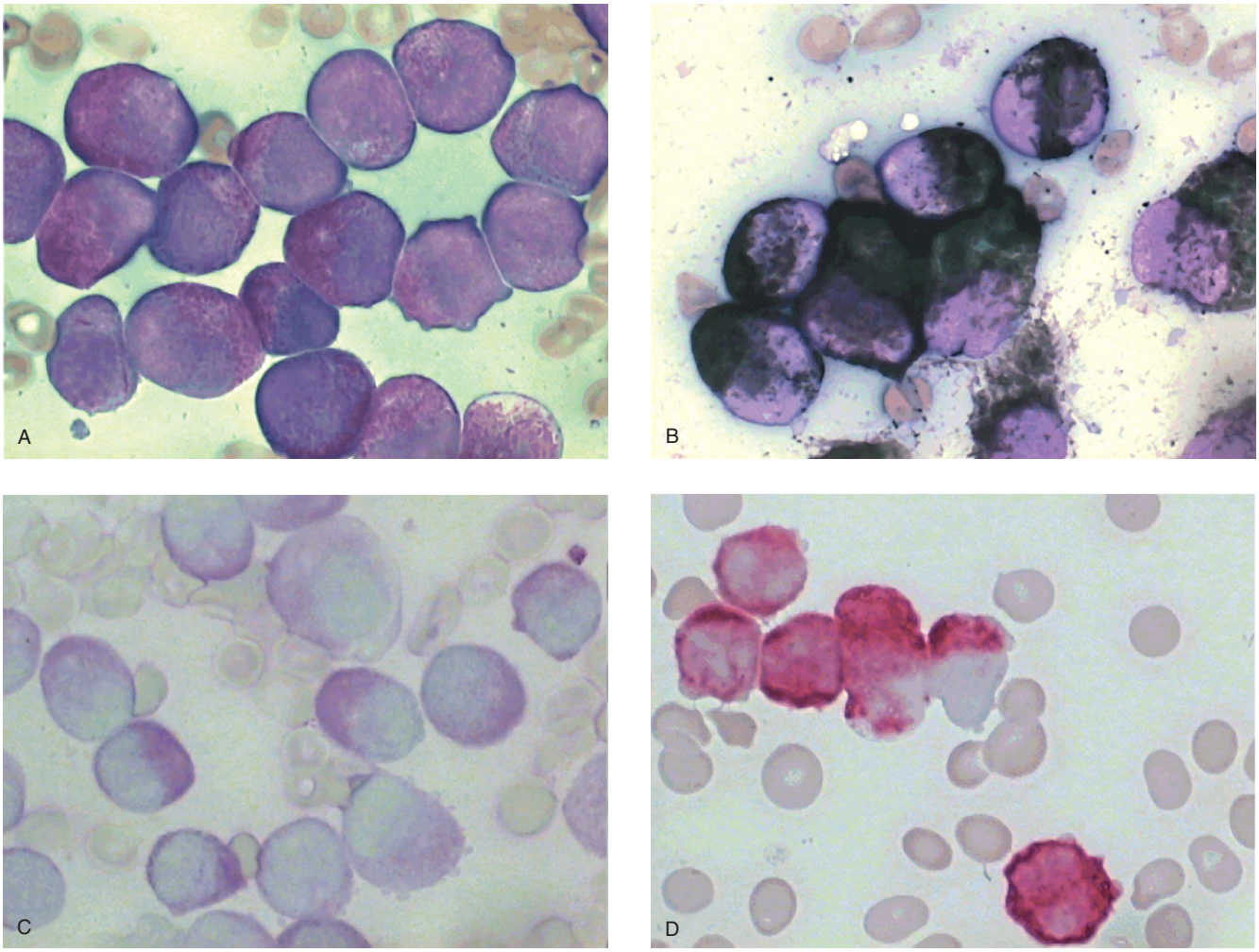


Figura 13.15. Leucemia promielocítica aguda. A: La tinción con May–Grünwald-Giemsa muestra promielocitos hipergranulares con bastones de Auer dispersos. B: Negro Sudán B con citoplasma fuertemente teñido. C: La tinción con ácido peryódico de Schiff muestra una nebulosa citoplasmática difusa. D: La cloroacetato esterasa da una tinción citoplasmática fuerte.

naftol AS y el acetato de naftol AS-D reaccionan tanto con las esterasas específicas como con las no específicas, pero únicamente la reacción con las ENE es inhibida por el NaF. Actualmente no se utilizan los métodos que emplean extensiones paralelas con y sin NaF porque, en general, se obtiene más información haciendo una combinación de las tinciones de cloroacetato esterasa y de una esterasa «no específica» en una sola extensión. Los métodos combinados tienen la ventaja de demostrar la doble tinción patológica de las células individuales. Todas las tinciones con esterasa pueden realizarse utilizando diversos reactivos acoplados, cada uno de los cuales da un producto de reacción con diferente coloración. Los métodos que se indican a continuación se han elegido por su simplicidad y fiabilidad.

Naftol AS-D cloroacetato esterasa[28]

Reactivos

Fijador. Acetona formalina tamponada (v. pág. 510).
Tampón. Tampón fosfato, 66 mmol/l a pH 7,4 (v. pág. 589).
Solución de sustrato de Naftol AS-D cloroacetato. Disolver 0,1 g de naftol AS-D cloroacetato (Sigma N-0758) en 40 ml de N,N-dimetilformamida (Sigma D-4254). Conservar en el frigorífico.
Solución de sustrato operativo. Añadir 2 ml de la solución de depósito de naftol AS-D cloroacetato a 38 ml de tampón fosfato, 66 mmol/l, a pH 7,4. Mezclar bien. Añadir 0,4 ml de nueva fucsina hexazotada recién preparada. Mezclar bien.

Reactivo de acoplamiento:

1. Nueva fucsina hexazotada. Disolver 4 g de nueva fucsina en 100 ml de HCl 2N.
2. Solución de nitrito sódico, 0,3 mol/l. Disolver 2,1 g de nitrito sódico ($NaNO_2$) en 100 ml de agua.
3. Inmediatamente antes de su utilización, añadir 0,2 ml de la nueva fucsina hexazotada a 0,4 ml de nitrito sódico, mezclar bien y dejar reposar durante 1 min antes de añadir a la solución de sustrato.

Contratinción. Hematoxilina acuosa.

Método

1. Fijar los frotis secados al aire durante 30 s en acetona formalina tamponada fría.
2. Aclarar con agua del grifo a baja presión y secar al aire.
3. Sumergir las extensiones en la solución de sustrato operativa en una cubeta de Coplin durante 5-10 min.
4. Aclarar con agua del grifo y secar al aire.
5. Contrateñir en hematoxilina acuosa durante 1 min.
6. «Azular» con agua del grifo a baja presión durante 1 min y secar al aire.

Consideraciones técnicas

La tinción con CAE es sólida y fiable. Una alternativa satisfactoria a la nueva fucsina son 40 mg de azul rápido BB, pero necesita un mezclado vigoroso y a conciencia con la solución sustrato.

El tiempo de incubación es importante porque la mayoría de las células hematopoyéticas muestran alguna tinción granular dispersa si la incubación se prolonga. La hidrólisis del sustrato es rápida, completándose prácticamente la tinción en 3-5 min.

Resultados e interpretación

El producto de reacción es rojo brillante (v. fig. 13.15D). Queda confinado a las células de las series de los neutrófilos y en los mastocitos. La actividad de la CAE citoplasmática aparece a medida que los mieloblastos maduran a promielocitos. La positividad en los mieloblastos es rara, pero los promielocitos y los mielocitos se tiñen intensamente, llenándose el citoplasma con el producto de reacción. Las células más tardías se tiñen fuertemente pero de forma menos intensa. Resulta por tanto de utilidad como marcador de la maduración citoplasmática en las leucemias mieloides.

En la leucemia promielocítica aguda, las células muestran una tinción citoplasmática masiva. Los múltiples bastones de Auer característicos se tiñen positivamente, a menudo con un vacío central. Es raro ver bastones de Auer positivos a la CAE en otras formas de LMA, excepto en casos con la translocación t(8;21)[55].

α-Naftil butirato esterasa

Reactivos

Fijador. Acetona formalina tamponada.
Tampón. Tampón fosfato, 100 mmol/l (Sorensen), a pH 8,0.
Solución madre de depósito. α-Naftil butirato (Sigma N-8125) 100 µl en 5 ml de acetona. La solución debe conservarse a –20 °C y es estable durante al menos 2 meses.
Reactivo de acoplamiento. Fast Garnet GBC (Sigma F 8761) 15 mg.
Contratinción. Hematoxilina acuosa.

Método

1. Fijar los frotis secados al aire durante 30 s en acetona formalina tamponada. Aclarar con agua del grifo a baja presión y secar al aire.
2. Añadir el Fast Garnet GBC a 50 ml de tampón y mezclar bien.
3. Añadir 0,5 ml de la solución α-naftil butirato/acetona y mezclar bien.
4. Verter el medio de incubación en una cubeta de Coplin que contenga las extensiones fijadas e incubar durante 20-40 min.
5. Enjuagar completamente con agua del grifo en la cubeta de Coplin hasta que se aclare.
6. Secar al aire y contrateñir con hematoxilina acuosa durante 1-5 min.

Consideraciones técnicas

El producto de reacción es soluble en el aceite de inmersión y en los medios de montaje sintéticos. Si las extensiones se van a examinar repetidamente, se deben montar en un medio acuoso (p. ej., medio de montaje con goma arábica de Apathy o con glicerina/gelatina). Puede haber variaciones entre los lotes del Fast Garnet GBC. La tinción se puede controlar retirando la extensión de control del medio de incubación a los 20 min, examinándola así húmeda con un objetivo de baja resolución (p. ej., ×20) y devolviéndola al medio de incubación mientras todavía está mojada. Cuando los monocitos se muestran de color marrón oscuro, la tinción se ha completado. La pararosanilina hexazotada es un reactivo de acoplamiento alternativo, que da un producto de reacción marrón insoluble y es adecuada para emplearla en un medio de montaje sintético[54].

Resultados e interpretación

El producto de reacción es marrón y granular (fig. 13.16). La mayoría de los monocitos (>80%) se tiñen fuertemente, el resto muestra una tinción débil. Es raro que haya monocitos negativos. Los neutrófilos, los eosinófilos, los basófilos y las plaquetas son negativos. Los linfocitos B son negativos y los linfocitos T se tiñen de forma poco fiable. En la médula ósea, los monocitos, los precursores de los monocitos y los macrófagos se tiñen fuertemente. El α-naftil

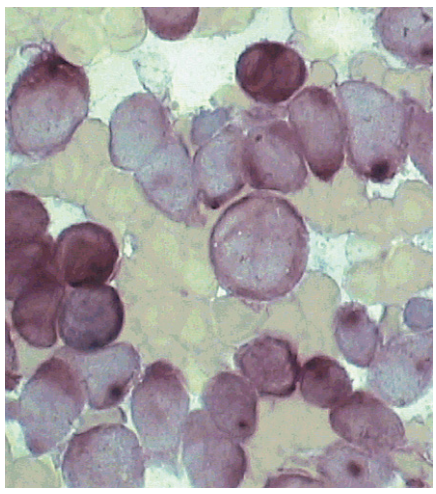


Figura 13.16. Esterasa no específica. Reacción positiva *(marrón)* en la leucemia normocítica aguda (FAB M5).

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

butirato es más específico para identificar un componente monocítico en la LMA que el α-naftil acetato (v. más adelante).

α-Naftil acetato esterasa

Reactivos

Fijador. Acetona formalina tamponada.
Tampón. Tampón fosfato, 66 mmol/l, a pH 6,3.
Solución de sustrato. Disolver 100 mg de α-naftil acetato (Sigma N-8505) en 5 ml de éter monometil etileno. Guardar a 4-10 °C.

Reactivo de acoplamiento:

1. Pararosanilina de depósito. Disolver 1 g de pararosanilina (Sigma n.º P-7632) en 25 ml de HCL caliente, 2 mol/l. Filtrarlo cuando se enfríe. Almacenar a temperatura ambiente en la oscuridad. Se conserva estable durante 2 meses.
2. Solución de nitrito sódico al 4%. Disolver 200 mg de nitrito sódico en 5 ml de agua destilada. Es estable durante 1 semana a 4-10 °C.
3. Pararosanilina hexazotada. Mezclar volúmenes iguales de pararosanilina y nitrito sódico al 4% durante 1 min antes de su utilización.

Medio de incubación. Añadir 2 ml de la solución de α-naftil acetato a 38 ml de tampón fosfato, 66 mmol/l, a pH 6,3. Mezclar bien. Añadir 0,4 ml de pararosanilina hexazotada recién preparada. Mezclar bien.
Contratinción. Hematoxilina acuosa.

Método

1. Fijar los frotis secados al aire durante 30 s en acetona formalina tamponada fría.
2. Aclarar con agua del grifo y secar al aire.
3. Sumergir las extensiones durante 30-60 min en el medio de incubación en una cubeta de Coplin.
4. Enjuagar con agua del grifo a baja presión en la cubeta de Coplin hasta que se aclare y secar al aire.
5. Contrateñir en hematoxilina acuosa durante 2-5 min.

Consideraciones técnicas

Se pueden utilizar 80 mg de azul rápido BB como sustituto del reactivo de acoplamiento. De esta forma se obtiene un producto de reacción granular de color verde-marrón oscuro, que es soluble en el medio de montaje y en el aceite de inmersión. Hay que ajustar el tiempo de tinción con hematoxilina hasta que se obtenga un detalle claro del núcleo sin sobreteñirlo para no oscurecer los nucléolos ni la textura de la cromatina.

Resultados e interpretación

El producto de reacción presenta una coloración rojo/marrón difusa. Tanto los monocitos normales como los leucémicos se tiñen fuertemente. Los granulocitos normales son negativos, pero en la mielodisplasia o en la LMA pueden dar reacciones positivas de diferente intensidad. Los megacariocitos se tiñen intensamente y los megacarioblastos leucémicos pueden mostrar positividad focal o difusa. La mayoría de los linfocitos T y algunos linfoblastos T muestran positividad focal «punteada»; no obstante, la immunofenotipificación ha sustituido a la citoquímica en la identificación y subclasificación de los linfocitos T. Los eritroblastos leucémicos pueden mostrar positividad focal o difusa.

Tinción secuencial con esterasas combinadas utilizando ANAE y CAE

Reactivos

Como se ha indicado en los apartados anteriores.

Método

1. Seguir el método y los pasos 1-4 enumerados anteriormente para la tinción con α-naftil acetato, enjuagar con agua del grifo y secar al aire.
2. Sin más fijación, preparar el medio de incubación del naftol AS-D cloroacetato como se ha explicado anteriormente, sustituyendo los 10 mg de azul rápido BB (Sigma n.º F 0250) por nueva fucsina hexazotada e incubar durante 10 min.
3. Enjuagar con agua del grifo y contrateñir con hematoxilina acuosa durante 1–3 min.

Consideraciones técnicas

El azul rápido BB es relativamente insoluble, y el medio de incubación con cloroacetato debe mezclarse vigorosamente antes de su utilización.

Resultados e interpretación

El ANAE da un producto de reacción marrón y el CAE da un producto azul brillante granular (fig. 13.17). Los patrones de tinción son idénticos a los observados con los dos colorantes utilizados separadamente. La técnica de la doble tinción evita la necesidad de comparar los resultados de las extensiones separadas y pone de manifiesto los patrones de tinción aberrantes. En las leucemias mielomonocíticas puede haber células que se tiñan con ambas esterasas. En la mielodisplasia y en la LMA con granulocitos displásicos puede haber células individuales con doble tinción. Esto puede tener su utilidad cuando el diagnóstico de SMD no está completamente confirmado, aunque se puede observar el mismo patrón anómalo en los estados displásicos no clonales, como la anemia megaloblástica.

Esterasa doble con incubación única (Naftol AS-D cloroacetato y α-Naftil butirato)[56]

Reactivos

Fijador. Acetona formalina tamponada.
Tampón. Tampón fosfato, 100 mmol/l (Sorensen), a pH 8,0.
Sustratos:

1. 2,5 mg de naftol AS-D cloroacetato (Sigma N-0758) en 1 ml de acetona.

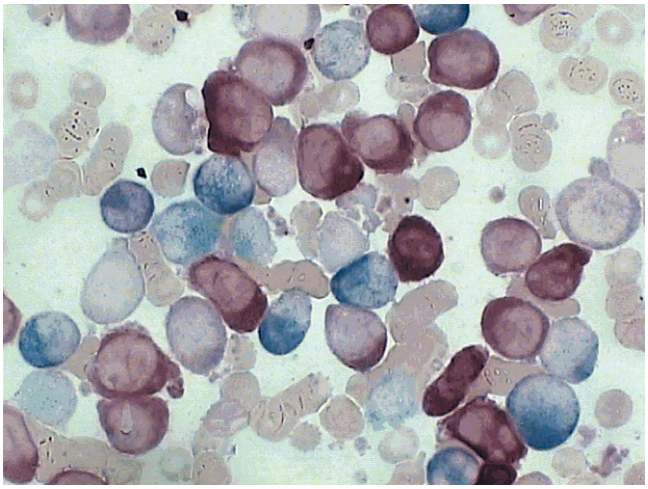


Figura 13.17. Tinción con esterasas combinadas. Leucemia mielomonocítica aguda con cantidades casi iguales de células positivas para la cloroacetato esterasa *(azul)* y para la esterasa no específica *(marrón)*.

2. 4 mg de α-naftil butirato (Sigma N-8000) en 1 ml de acetona.

Reactivo de acoplamiento. Azul rápido BB sal (Sigma n.º F-0250).
Contratinción. Hematoxilina acuosa.

Método

1. Fijar los frotis secados al aire durante 30 s en acetona formalina tamponada.
2. Aclarar con agua del grifo y secar al aire.
3. Disolver 80 mg de azul rápido BB en 50 ml de tampón fosfato mezclando vigorosamente.
4. Añadir naftol AS-D cloroacetato y mezclar bien.
5. Añadir α-naftil butirato y mezclar bien.
6. Incubar las extensiones durante 10-15 min en una cubeta de Coplin en la oscuridad.
7. Enjuagar la cubeta de Coplin con un chorro de agua del grifo hasta que se aclare.
8. Secar las extensiones al aire.
9. Contrateñir en hematoxilina acuosa durante 1 min, aclarar y secar al aire.

Consideraciones técnicas

Los pasos 4 y 5 deben realizarse rápidamente. La tinción puede aumentarse a 30 min si es necesario para garantizar una tinción masiva con la ANBE, pero cuanto mayor sea el tiempo de incubación más probabilidades hay de tinciones granulares inespecíficas con el CAE.

Resultados e interpretación

El producto de reacción de la CAE es azul brillante (granulocitos); el producto de la ANBE es verde/marrón oscuro (monocitos). La ANBE no tiñe los megacariocitos o los linfocitos T tan fuertemente como el α-naftil acetato. Lam y cols. recomiendan el uso de pararosanilina hexazotada como reactivo de acoplamiento en una única incubación de las esterasas combinadas, lo que da productos de reacción contrastados rojo brillante y marrón[57].

En la LMA, la tinción es útil para identificar los componentes monocíticos y granulocíticos.

Colorante azul de toluidina

El colorante azul de toluidina es útil para la enumeración de los basófilos y de los mastocitos. Se une fuertemente a los gránulos de estas células y tiene una importancia particular en aquellos estados patológicos cuyas células no pueden identificarse fácilmente con los colorantes de Romanowsky. En la LMA, la LMC y en otros trastornos mieloproliferativos, los basófilos pueden ser displásicos y con escasa granularidad, igual que los mastocitos en algunas formas de mastocitosis adquiridas.

Reactivos

Azul de toluidina al 1% p/v en metanol. Añadir 1 g de azul de toluidina (BDH 34077) a 100 ml de metanol y mezclarlos durante 24 h en un rodillo o con un agitador magnético. La tinción es estable indefinidamente a temperatura ambiente. Conservar herméticamente cerrado.

Método

1. Colocar los frotis secados al aire en una gradilla de tinción y sumergirlos en la solución con azul de toluidina.
2. Incubar durante 5-10 min.
3. Enjuagar brevemente con agua del grifo a baja presión hasta que se aclare y secar al aire.

Resultados e interpretación

Los gránulos de los basófilos y de los mastocitos se tiñen con un color rojo/púrpura brillante que los diferencia y distingue (fig. 13.18). Los núcleos se tiñen de azul y las células con abundante ARN pueden mostrar un tinte azul en el citoplasma. Aunque se dice que el azul de toluidina es

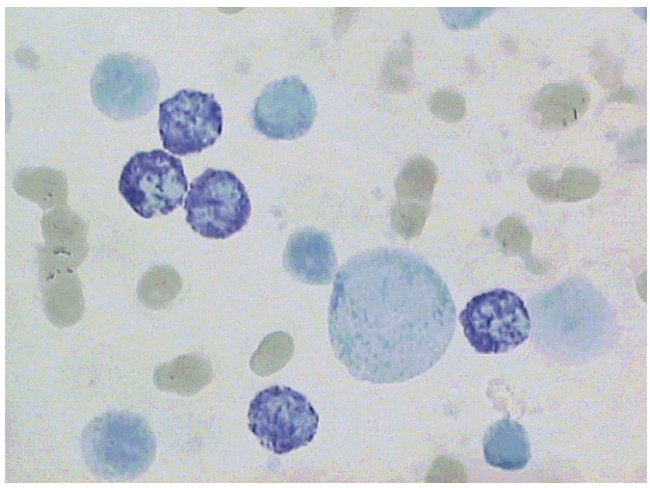


Figura 13.18. Azul de toluidina. Leucemia mieloide crónica en fase acelerada. Hay cinco basófilos fuertemente positivos.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

específico para estos gránulos, si la incubación es >10 min, los gránulos primarios de los promielocitos se tiñen de rojo/púrpura. Sin embargo son más pequeños y sutiles que los gránulos de los mastocitos o de los basófilos y, por tanto, fácilmente diferenciables.

Reacciones citoquímicas y clasificación de las leucemias

Síndromes mielodisplásicos y leucemia mieloide aguda

El SMD es un trastorno preleucémico clónico adquirido de la médula ósea, caracterizado principalmente por una médula celular o hipercelular, citopenias periféricas y anomalías morfológicas variables de las células hematopoyéticas. El sistema de clasificación propuesto por el grupo cooperativo francés-americano-británico (FAB) en 1982[58] se utilizó extensamente durante muchos años, pero ahora está siendo sustituido por la clasificación de la OMS (v. cap. 23). La reacción de Perls para la hemosiderina es fundamental para la demostración de los sideroblastos en anillo. Otras pruebas citoquímicas de la displasia son la doble tinción de las células con el cloroacetato y el ANAE, la presencia de neutrófilos negativos para la MPO o el NSB y la presencia de bastones de Auer (NSB y MPO).

En la LMA, la citoquímica es útil para definir las células monocíticas (ANAE y ANBE), para identificar los bastones de Auer y para poner de manifiesto la displasia (como se ha mencionado anteriormente).

Leucemia linfoblástica aguda

El diagnóstico y la clasificación moderna de las LLA se hacen por citología, seguida de immunofenotipificación (v. cap. 14). Si no se dispone de inmunofenotipado, la citoquímica mantiene su importancia. Hay que indicar que, en la coloración de Romanowsky, los linfoblastos pueden contener gránulos azurófilos finos en contadas ocasiones. Sin embargo, nunca se observan bastones de Auer y la MPO y la CAE son negativas, haya o no gránulos finos. En ocasiones los gránulos presentan una reacción débil con el NSB. Aunque no sea específico de ninguna estirpe, cualquier patrón de positividad al PAS[30] puede ser de utilidad. En la LLA, el 95% de los casos muestran bloques o gránulos positivos de material rojo brillante positivo al PAS. Pueden estar presentes en muy pocos blastos (<1%) o en la mayoría. La diferencia fundamental con la positividad granular o en bloque en otras células leucémicas es el fondo cristalino del citoplasma en los linfoblastos. Los mieloblastos, los monoblastos, los eritroblastos leucémicos y los megacarioblastos muestran algún grado de positividad citoplasmática difusa y, en ocasiones, se observa positividad en bloques. La tinción con fosfatasa ácida tiene más probabilidad de dar una positividad focal en las leucemias agudas de los linfocitos B que en las de los T, pero la diferencia no es lo suficientemente clara para ofrecer una certeza diagnóstica y, a veces, también se observa la positividad focal en los eritroblastos de las eritroleucemias. La tinción con esterasas es, por lo general, poco útil; algunos casos de linfocitos T muestran positividad focal con ANAE, pero es inespecífica.

Trastornos mieloproliferativos crónicos

Aunque los valores bajos de la FAG son típicos de la fase crónica de la LMC y los valores elevados se encuentran habitualmente en otros trastornos mieloproliferativos, el hallazgo de un valor elevado de la FAG es demasiado inespecífico para tener utilidad diagnóstica.

Trastornos linfoproliferativos crónicos

Los trastornos linfoproliferativos crónicos se identifican actualmente por inmunofenotipado. Las reacciones para las hidrolasas ácidas (fosfatasa ácida, ANAE, β-glucuronidasa y β-glucosaminidasa) muestran positividad focal en la mayoría de los trastornos de los linfocitos T pero son negativas en los trastornos de los linfocitos B. La reacción de la fosfatasa ácida resistente al tartrato en la leucemia de las células peludas es la única tinción citoquímica con la especificidad suficiente para ser considerada aún de utilidad diagnóstica (en ausencia de inmunofenotipado).

BIBLIOGRAFÍA

1. Grüneberg H 1941 Siderocytes: a new kind of erythrocyte. Nature (London) 148:114–115.
2. Pappenheimer AM, Thompson KP, Parker DD, et al 1945 Anaemia associated with unidentified erythrocytic inclusions after splenectomy. Quarterly Journal of Medicine 14:75–100.
3. Kaplan E, Zuelzer WW, Mouriquand C 1954 Sideroblasts: a study of stainable nonhemoglobin iron in marrow normoblasts. Blood 9:203–213.
4. Crosby WH 1957 Siderocytes and the spleen. Blood 12: 165–170.
5. Sundberg RD, Bromann H 1955 The application of the Prussian blue stain to previously stained films of blood and bone marrow. Blood 10:160–166.
6. Hayhoe FGJ, Quaglino D 1960 Refractory sideroblastic anaemia and erythraemic myelosis: possible relationship and cytochemical observations. British Journal of Haematology 6:381–387.
7. Kass L, Eickholt MM 1978 Rapid detection of ringed sideroblasts with bromchlorphenol blue. American Journal of Clinical Pathology 70:738–740.
8. Bennett JM 1986 Classification of the myelodysplastic syndromes. Clinics in Haematology 15:909–923.
9. Rath CE, Finch CA 1948 Sternal marrow hemosiderin: a method for the determination of available iron stores in man. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 33:81–86.
10. Hughes DA, Stuart-Smith SE, Bain BJ2004 How should stainable iron in bone marrow films be assessed? Journal of Clinical Pathology 57:1038–1040.
11. Heinz R 1890 Morphologische Veränderungen der rother Blutkörperchen durche Gifte. Virchows Archiv 122:112.
12. Dacie JV, Grimes AJ, Meisler A, et al 1964 Hereditary Heinz-body anaemia: a report of studies on five patients with mild anaemia. British Journal of Haematology 10:388–402.
13. Jacob HS 1970 Mechanisms of Heinz body formation and attachment to red cell membrane. Seminars in Hematology 7:341–354.
14. White JM 1976 The unstable haemoglobins. British Medical Bulletin 32:219–222.

15. Eisinger J, Flores J, Tyson JA, et al 1985 Fluorescent cytoplasm and Heinz bodies of hemoglobin Köln erythrocytes: evidence for intracellular heme catabolism. Blood 65: 886–893.
16. Schwab MLL, Lewis AE 1969 An improved stain for Heinz bodies. American Journal of Clinical Pathology 51:673.
17. Simpson CF, Carlisle JW, Mallard L 1970 Rhodanile blue: a rapid and selective stain for Heinz bodies. Stain Technology 45:221–223.
18. Gouttas A, Fessas Ph, Tsevrenis H, et al 1955 Description d'une nouvelle variété d'anémie hémolytique congénitale. Sang 26:911–919.
19. Lin CK, Gau JP, Hsu HC, et al 1990 Efficacy of a modified technique for detecting red cell haemoglobin H inclusions. Clinical and Laboratory Haematology 12:409–415.
20. Kleihauer E, Betke K 1963 Elution procedure for the demonstration of methaemoglobin in red cells of human blood smears. Nature (London) 199:1196–1197.
21. Kleihauer E, Braun H, Betke K 1957 Demonstration von fetalem Hämoglobin in den Erythrocyten eines Blutausstrichs. Klinische Wochenschrift 35:637–638.
22. Nierhaus K, Betke K 1968 Eine vereinfachte Modifikation der säuren Elution für die cytologische Darstellung von fetalem Hämoglobin. Klinische Wochenschrift 46:47.
23. Clayton EM, Felhaus WD, Phythyon JM 1963 The demonstration of fetal erythrocytes in the presence of adult red blood cells. American Journal of Clinical Pathology 40: 487–490.
24. Tomoda Y 1964 Demonstration of foetal erythrocytes by immunofluorescent staining. Nature (London) 202:910–911.
25. Thorpe SJ, Huehns EG 1983 A new approach for the antenatal diagnosis of β-thalassaemia: a double labelling immunofluorescence microscopy technique. British Journal of Haematology 53:103–112.
26. Headings V, Bhattacharya S, Shukla S, et al 1975 Identification of specific hemoglobins within individual erythrocytes. Blood 45:263–271.
27. Papayannopoulou Th, McGuire TC, Lim G, et al 1976 Identification of haemoglobin S in red cells and normoblasts using fluorescent anti-Hb antibodies. British Journal of Haematology 34:25–31.
28. Shibata A, Bennett JM, Castoldi GL, et al 1985 Recommended methods for cytological procedures in haematology. Clinical and Laboratory Haematology 7:55–74.
29. International Council for Standardization in Haematology 1993 Procedures for the classification of acute leukaemias. Leukemia and Lymphoma 11:37–48.
30. Hayhoe FGJ, Quaglino D 1988 Haematological cytochemistry, 2nd ed. Churchill Livingstone, Edinburgh.
31. Graham RC, Karnovsky MJ 1966 The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. Journal of Histochemistry and Cytochemistry 14:291–302.
32. Novikoff AB, Goldfischer S 1969 Visualization of peroxisomes (microbodies and mitochondria with diaminobenzidine). Journal of Histochemistry and Cytochemistry 17: 675–680.
33. Elias JM 1980 A rapid sensitive myeloperoxidase stain using 4-chloro-1-naphthol. American Journal of Clinical Pathology 73:797–799.
34. Graham RC, Lundholm U, Karnovsky MJ 1965 Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-9-ethylcarbazole. Journal of Histochemistry and Cytochemistry 13:150–152.
35. Lillie RD, Burtner HJ 1953 Stable sudanophilia of human neutrophil leucocytes in relation to peroxidase and oxidase. Journal of Histochemistry and Cytochemistry 1:8–26.
36. Sheehan HL, Storey GW 1974 An improved method of staining leucocyte granules with Sudan Black B. Journal of Pathology and Bacteriology 49:580.
37. Stass SA, Pui C-H, Mel Vin S, et al 1984 Sudan black B positive acute lymphoblastic leukaemia. British Journal of Haematology 57:413–421.
38. Rosner F, Lee SL 1965 Endocrine relationships of leukocyte alkaline phosphatase. Blood 5:356–369.
39. Poppema S, Elema JD, Halie MR 1981 Alkaline phosphatase positive lymphomas: a morphologic, immunologic and enzyme histochemical study. Cancer 47:1303–1312.
40. Gomori G 1952 Microscopic histochemistry: principles and practice. University of Chicago Press, Chicago.
41. Kaplow LS 1955 A histochemical procedure for localizing and evaluating leucocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. Blood 10:1023–1029.
42. Kaplow LS 1963 Cytochemistry of leukocyte alkaline phosphatase: use of complex naphthol AS phosphates in azo-dye coupling technics. American Journal of Clinical Pathology 39:439–449.
43. Rustin GJS, Wilson PD, Peters TJ 1979 Studies on the subcellular localisation of human neutrophil alkaline phosphatase. Journal of Cell Science 36:401–412.
44. Kaplow LS 1968 Leukocyte alkaline phosphatase cytochemistry: applications and methods. Annals of the New York Academy of Sciences 155:911.
45. Hayhoe FGJ, Quaglino D 1958 Cytochemical demonstration and measurement of leucocyte alkaline phosphatase in normal and pathological states by modified azo-dye coupling technique. British Journal of Haematology 4:375–389.
46. Rutenberg AB, Rosales CL, Bennett JM 1965 An important histochemical method for the demonstration of leukocyte alkaline phosphatase activity: clinical applications. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 65:698–705.
47. Bendix-Hansen K, Helleberg-Rasmussen I 1985 I. Evaluation of neutrophil alkaline phosphatase: untreated myeloid leukaemia, lymphoid leukaemia and normal humans. Scandinavian Journal of Haematology 34:264–269.
48. Yam LT, Li CY, Lam KW 1971 Tartrate-resistant acid phosphatase isoenzyme in the reticulum cells of leukemic reticuloendotheliosis. New England Journal of Medicine 284:357.
49. Li CY, Yam LT, Lam KW 1970 Acid phosphatase isoenzyme in human leucocytes in normal and pathologic conditions. Journal of Histochemistry and Cytochemistry 18:473–481.
50. Goldberg AF, Barka T 1962 Acid phosphatase activity in human blood cells. Nature 195:297.
51. Hotchkiss RD 1948 A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. Archives of Biochemistry 16:131–141.
52. Higgy KE, Burns GF, Hayhoe FGJ 1977 Discrimination of B, T and null lymphocytes by esterase cytochemistry. Scandinavian Journal of Haematology 18:437–438.
53. Quaglino D, Hayhoe FGJ 1959 Observations on the periodic acid-Schiff reaction in lymphoproliferative diseases. Journal of Pathology and Bacteriology 78:521–532.
54. Li CY, Yam LT, Lam KW 1973 Esterases in human leucocytes. Journal of Histochemistry and Cytochemistry 21:1.
55. Swirsky DM, Li YS, Matthews JG, et al 1983 Translocation

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

in acute granulocytic leukaemia: cytological, cytochemical and clinical features. British Journal of Haematology 56: 199–213.
56. Swirsky DM 1984 Single incubation double esterase cytochemical reaction using a single coupling reagent. Journal of Clinical Pathology 37:1187–1190.
57. Lam KW, Li CY, Yam LT 1985 Simultaneous demonstration of non-specific esterase and chloro-acetate esterase in human blood cells. Stain Technology 60:169–172.
58. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, et al 1982 Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. British Journal of Haematology 51:189–199.

14 Inmunofenotipado

Estella Matutes, Ricardo Morilla y Daniel Catovsky

Métodos para el estudio de marcadores inmunológicos 288
Preparación de las muestras y separación celular 288
Detección de antígenos de membrana 288
Detección de inmunoglobulinas de superficie 289
Detección de antígenos intracelulares 290
Citometría de flujo multicolor 291
Cuantificación de los antígenos 291
Inmunocitoquímica 293
Marcadores inmunológicos en la leucemia aguda 295
Marcadores inmunológicos en trastornos linfoproliferativos crónicos 297
Marcadores inmunológicos para la detección de la enfermedad mínima residual 301

INTRODUCCIÓN

Desde el desarrollo de la tecnología de los hibridomas en la década de los años setenta, ha habido grandes avances en la caracterización inmunofenotípica de las enfermedades malignas hematopoyéticas y éstos, a su vez, han llevado a una mejor comprensión de la diferenciación hematopoyética normal. Antes de disponer de anticuerpos monoclonales (AcMo), era posible distinguir un linfocito B de uno T y de una célula linfoide precursora temprana por la expresión de inmunoglobulinas citoplásmicas o de superficie en los linfocitos B, por la capacidad de los linfocitos T de formar rosetas con los eritrocitos de cordero (rosetas -E) y por la expresión de la enzima nuclear desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) en los precursores linfoides. A lo largo de las dos últimas décadas, la aplicación de nuevas tecnologías ha tenido un gran impacto en el diagnóstico de leucemias crónicas y agudas, ha aportado pistas a la patogénesis de estas alteraciones y ha hecho posible monitorizar pequeñas cantidades de células leucémicas residuales. Mas allá de este valor diagnóstico, algunos AcMo quiméricos, como aquellos que reconocen los antígenos CD20, CD52 y CD33, se usan *in vivo* como herramientas terapéuticas; por lo tanto, su estimación en las células leucémicas se ha convertido en una cuestión clínica importante.

Aparte de disponer de un gran número de AcMo que identifican antígenos en las células hematopoyéticas, que son específicos de linaje o que están restringidos a niveles particulares de diferenciación, se han desarrollado una serie de técnicas inmunológicas que permiten lo siguiente:

1. Detección de antígenos tanto nucleares como de membrana y citoplásmicos por medio de citometría de flujo en células previamente fijadas y estabilizadas.
2. Inmunotinción doble, triple y cuádruple simultánea con AcMo directamente marcados con diferentes fluorocromos.
3. Análisis de muestras de sangre total o de la médula ósea sin que sea necesaria la separación de células mononucleares.
4. Cuantificación del número de moléculas de un antígeno en una única célula.
5. Análisis o cuantificación de poblaciones celulares seleccionadas, como la estimación de las células madre CD34 aplicando diversas estrategias con células CD45 marcadas.

Aunque se reconoce la importancia de un buen diagnóstico por inmunofenotipado, los resultados deberían interpretarse siempre teniendo en cuenta la morfología y otros datos relevantes, ya sean clínicos o de laboratorio.

Este capítulo incluye la descripción de:

1. Técnicas utilizadas actualmente para el inmunofenotipado.
2. Listas de marcadores útiles para el diagnóstico de leucemia aguda y de alteraciones linfoproliferativas crónicas y el razonamiento para su selección.
3. Perfiles inmunofenotípicos que caracterizan a los diferentes tipos de leucemias agudas y alteraciones linfoproliferativas crónicas.
4. Nuevos AcMo (p. ej., contra el producto del gen supresor de tumores p53, CD38, ZAP-70 y ciclina D1), los cuales son relevantes para el pronóstico y el diagnóstico diferencial entre trastornos linfoides.
5. Estrategias para determinar una enfermedad mínima residual (EMR) mediante el inmunofenotipado.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE MARCADORES INMUNOLÓGICOS

Hay varias formas de analizar los marcadores celulares:

1. Citometría de flujo para analizar las suspensiones de células viables o células fijadas.
2. Inmunocitoquímica para examinar células en extensiones hechas con citocentrífuga o directamente sobre extensiones de sangre o médula ósea.
3. Inmunohistoquímica para estudiar células en secciones congeladas o incrustadas en parafina de muestras de biopsia de médula ósea o de otros tejidos hematopoyéticos.

Los primeros dos métodos se emplean en los laboratorios de hematología que llevan a cabo el análisis de muestras de leucemia, y el último se utiliza, como norma, en los laboratorios de histopatología.

Preparación de las muestras y separación celular

El inmunofenotipado se puede llevar a cabo en células mononucleares aisladas, como se describe más adelante en este capítulo, o bien sobre muestras de sangre total utilizando soluciones lisantes.

La fracción de células mononucleares contiene linfocitos, monocitos, blastos y otras células mononucleares (según la muestra). Los métodos para separar células mononucleares incluyen la centrifugación con gradiente de densidad con Ficoll-Triosil, Hypaque o Lymphoprep. Cuando sea necesario, se pueden extraer las plaquetas mediante la desfibrinación de la sangre antes de la separación.

Método Lymphoprep (Nycomed) de separación

Diluir 10 ml de sangre anticoagulada (p. ej., heparinizada o anticoagulada con ácido etilendiaminotetraacético [EDTA]), en un volumen igual de tampón fosfato salino (PBS), pH 7,3 (v. pág. 589) o solución de Hanks. Añadir 10 ml de la sangre diluida, gota a gota, a 7,5 ml de Lymphoprep y centrifugar durante 30 min a 2.000 rpm (aproximadamente 500 g, v. pág. 592). Aparecen tres capas visibles: una capa de células mononucleares en el centro y eritrocitos y neutrófilos en el fondo. Tras quitar el plasma, pipetear la capa de células mononucleares a otro tubo y lavar tres veces con la solución de Hanks o con medio de cultivo tisular.

Método de lisis

Las muestras de sangre y médula ósea se tratan con una de las soluciones hipotónicas lisantes de eritrocitos con bases NH_4Cl^- disponibles en el mercado que contenga reactivos. A menudo las suministran los fabricantes de AcMo (p. ej., solución lítica FACS, BD Biosciences). Las muestras se tratan durante la incubación con los AcMo (v. más adelante), sin pérdida de las fracciones de las células mononucleares. El tiempo de incubación con el reactivo lítico es importante, porque una exposición prolongada puede alterar los patrones de dispersión de la luz hacia delante y lateralmente (FSC/SSC), mientras que una exposición demasiado breve puede dejar eritrocitos intactos, lo que conducirá a un exceso de impurezas y resultados imprecisos.

Previamente a la incubación con la solución lisante, se estima el número de leucocitos de la sangre o de la médula ósea de la muestra y, si fuera necesario, habría que diluir la muestra hasta una concentración máxima de leucocitos de 25-30 × 10^6 células/ml.

Métodos de citometría de flujo

El inmunofenotipado de las suspensiones de células es el método para detectar antígenos de membrana en células viables, y antígenos citoplásmicos y nucleares en células previamente fijadas y estabilizadas. Si no se dispone de un citómetro de flujo, la lectura también se puede realizar mediante microscopia de fluorescencia. Tanto la citometría de flujo como la microscopia de fluorescencia permiten la detección simultánea de antígenos de membrana y nucleares o citoplásmicos por medio de una doble o triple inmunotinción.

Detección de antígenos de membrana

Inmunofluorescencia directa

Para la inmunofluorescencia directa (doble tinción) (fig. 14.1), etiquetar los tubos de ensayo con el nombre del paciente, el tipo de muestra, el número de laboratorio y la combinación de AcMo conjugados con fluorocromo, incluyendo los controles isotópicos. Estos últimos son la inmunoglobulina (Ig) de ratón del mismo isótopo que el AcMo, pero sin especificidad antigénica.

Pipetear 100 µl de la muestra (sangre periférica total o médula ósea) en un tubo.

Añadir la combinación adecuada de AcMo marcado con fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) o un tercer fluorocromo en tándem (Cy5.PE) para aparatos con un láser con estimulación a 488 nm. Hay más de una docena de fluorocromos que se pueden usar para el inmunofenotipado, y, de hecho, algunos análisis utilizan hasta 11 colores. Las limitaciones acerca de qué citocromo se puede usar dependerá del número de láser y de detectores disponibles en el aparato. El volumen de AcMo oscila entre 5 y 20 µl, según las instrucciones del fabricante.

Incubar a temperatura ambiente durante 15 min.

Añadir 1 ml de la solución lisante (disponible en el mercado) y dejar durante 10 min a temperatura ambiente. Centrifugar durante 5 min a 2.000 rpm y desechar el sobrenadante.

Añadir 2 ml de PBS (pH 7,3) con azida sódica al 0,02%, albúmina sérica bovina (ASB) al 0,02% y EDTA al 0,01% (PBS-azida-ASB). Centrifugar durante 5 min a 2.000 rpm y desechar el sobrenadante.

Añadir 2 ml de PBS-azida-ASB o solución de Hanks, centrifugar durante 5 min a 2.000 rpm y desechar el sobrenadante.

Volver a suspender las células en 0,2-0,5 ml de solución de flujo (p. ej., Isoton, Beckman Coulter).

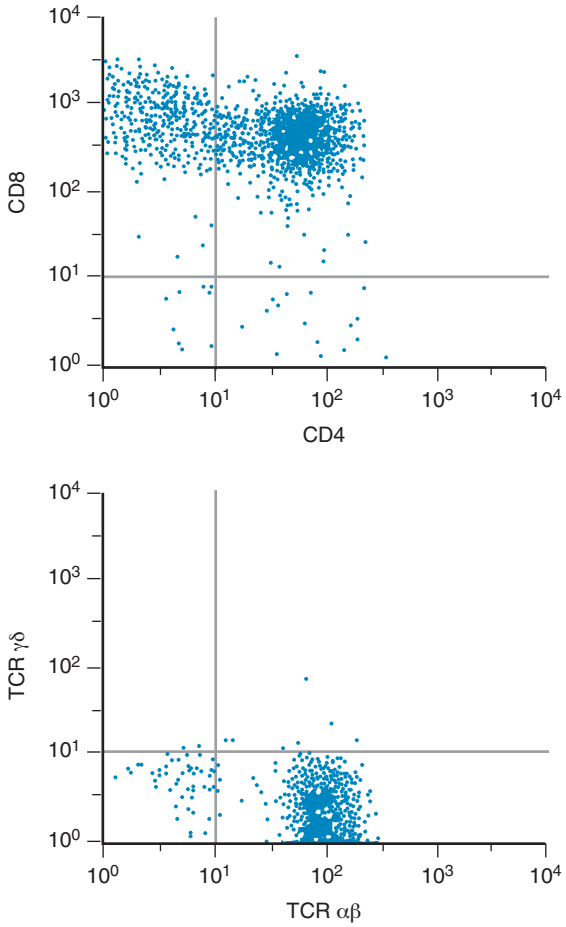


Figura 14.1. Tinción de inmunofluorescencia directa doble. Parte superior: diagrama de puntos que muestra la coexpresión de CD4 y CD8 en las células de un caso de leucemia prolinfocítica de linfocitos T. Parte inferior: diagrama de puntos que muestra que la mayoría de linfocitos expresan en su membrana el complejo receptor de linfocitos T (TCR) αβ y que son negativos para el AcMo contra el complejo TCR γδ.

Leer en un citómetro de flujo o mediante microscopia de fluorescencia después de montar las células en un portaobjetos.

Inmunofluorescencia indirecta (tinción simple)

Etiquetar los tubos de ensayo con el nombre del paciente, el tipo de muestra, el número de laboratorio y el AcMo.

Añadir 100 µl de la muestra (sangre total o médula ósea).

Añadir el AcMo adecuado (primera capa de anticuerpo no marcado). El volumen oscila entre 5 y 20 µl, según las instrucciones del fabricante. Incubar a temperatura ambiente durante 15 min.

Añadir 2 ml de PBS-azida-ASB o solución de Hanks; centrifugar durante 5 min a 2.000 rpm.

Desechar el sobrenadante y repetir este paso una vez más.

Siguiendo las instrucciones del fabricante, añadir el volumen y la concentración adecuados del segundo estrato, el cual es por lo general un fragmento de Ig F(ab)2 de cabra o conejo antiratón.

Incubar durante 15 min a temperatura ambiente.

Añadir 1 ml de la solución lisante (disponible en el mercado por el fabricante de AcMo) durante 10 min a temperatura ambiente. Centrifugar durante 5 min a 2.000 rpm y desechar el sobrenadante.

Añadir 2 ml de PBS-azida-ASB, centrifugar durante 5 min a 2.000 rpm y desechar el sobrenadante tras la centrifugación.

Volver a suspender las células en 0,25-0,5 ml de solución de flujo (p. ej., Isoton) proporcionado por el fabricante.

Leer en un citómetro de flujo o mediante microscopia de fluorescencia.

Detección de inmunoglobulinas de superficie

Las cadenas pesadas y ligeras de las Ig de superficie se pueden detectar mediante inmunotinciones dobles o triples. La finalidad es demostrar la clonalidad de una población de linfocitos B. La doble tinción utiliza un anticuerpo policlonal antikappa y antilambda conjugados de doble color, marcados con diferentes fluorocromos en un único tubo (fig. 14.2) o combina un marcador de linfocitos B etiquetado con FITC (p. ej., CD19) y un anticadena ligera marcado con PE, ya sea antikappa como antilambda. La inmunotinción de triple color combina un antikappa conjugado con FITC, un antilambda conjugado con PE, y un marcador de linfocitos B (p. ej., CD19) marcado con un tercer color en un único tubo.

La inmunotinción de las Ig de superficie difiere del método utilizado para detectar otros antígenos de superficie por AcMo. La razón es que la Ig sérica soluble cubre la superficie de las células, principalmente de los monocitos aunque también de los linfocitos, e interfiere en la detección de Ig, lo que lleva a resultados engañosos, tanto falsos positivos como falsos negativos. Para solventar este problema, hay que lavar las células con la solución de Hanks o con PBS antes de incubarlas con los reactivos antikappa y antilambda.

Hay dos métodos apropiados para detectar las Ig de superficie en las células sanguíneas o de la médula ósea, dependiendo de si el primer paso es un lavado en PBS o un proceso de lisis.

Método 1 (lavado con PBS primero, no lisado)

Etiquetar los tubos con el nombre del paciente, el tipo de muestra, el número de laboratorio y el AcMo.

Pipetear 100 µl de la muestra (sangre periférica total o médula ósea) en un tubo.

Añadir 2 ml de PBS-azida-ASB mantenido a 37 °C, y centrifugar durante 5 min a 2.000 rpm. Desechar el sobrenadante cuidadosamente utilizando una pipeta. Repetir este paso y volver a suspender la muestra en 50 µl de PBS-azida-ASB.

Añadir la combinación apropiada de AcMo: por ejemplo, antikappa y antilambda o CD19 y antikappa. El volumen

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

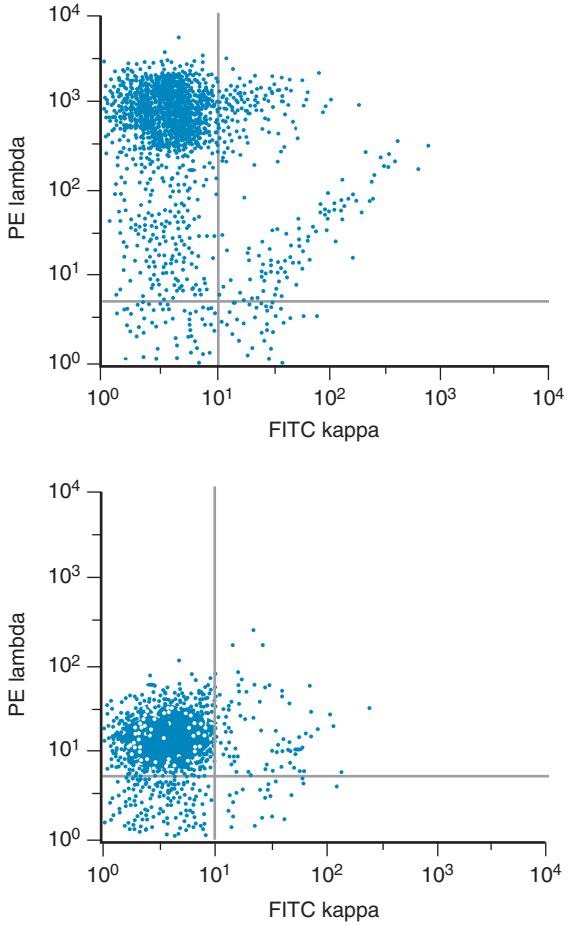


Figura 14.2. Tinción de la cadena ligera de la inmunoglobulina de superficie. Parte superior: diagrama de puntos que muestra una expresión intensa de la cadena ligera lambda en un caso de linfoma folicular. Parte inferior: al contrario que el caso superior, se ve una expresión débil/tenue de la cadena ligera lambda en un caso de leucemia linfocítica crónica. Las células son negativas para antikappa en los dos casos.

de AcMo se encuentra normalmente entre 5 y 20 µl, según las instrucciones del fabricante.

Incubar a temperatura ambiente durante 15 min.

Añadir 1 ml de la solución lisante (disponible en el mercado de la mayoría de los fabricantes de AcMo) e incubar durante 10 min a temperatura ambiente.

Añadir 1 ml de PBS-azida-ASB o solución de Hanks, centrifugar durante 5 min a 2.000 rpm y desechar el sobrenadante. Repetir este paso.

Volver a suspender las células en 0,2-0,5 ml de solución de flujo (p. ej., Isoton).

Leer en un citómetro de flujo o por microscopia de fluorescencia.

Método 2 (lisado como primer paso)

Etiquetar los tubos de ensayo con el nombre del paciente, el tipo de muestra, el número de laboratorio y el AcMo.

Pipetear 100 µl de la muestra (sangre periférica total o médula ósea).

Añadir 2 ml de la solución lisante, incubar durante 10 min a temperatura ambiente y lavar dos veces en PBS-azida-ASB.

Añadir el volumen apropiado de la combinación de AcMo, según las recomendaciones del fabricante.

Incubar durante 15 min a 4 °C. Añadir 2 ml de PBS-azida-ASB o solución de Hanks, centrifugar durante 5 min a 2.000 rpm y desechar el sobrenadante. Repetir este paso.

Volver a suspender las células en 0,2-0,5 ml de solución de flujo (p. ej., Isoton) y leer en un citómetro de flujo.

Detección de antígenos intracelulares

Existen diversos equipos disponibles en el mercado que contienen soluciones para fijar y estabilizar las células y detectar así antígenos citoplásmicos o nucleares. En conjunto, estos reactivos tienen poco o ningún efecto en el patrón de dispersión de la luz, aunque su fiabilidad y estabilidad a la hora de detectar antígenos citoplásmicos y nucleares concretos puede variar[1,2]. Los equipos contienen dos soluciones: la solución A es un agente fijador basado en una solución de paraformaldehído, y la solución B es un agente estabilizador basado en una combinación de una solución lisante y un detergente.

Para cada método hay que seguir las instrucciones del fabricante del equipo. Los detalles siguientes son para el método que usa Fix&Perm (Caltag, Burlingame, California, Estados Unidos).

Método

Etiquetar los tubos de ensayo con el nombre del paciente, el tipo de muestra, el número de laboratorio y el AcMo.

Pipetear 100 µl de la muestra (sangre periférica total o médula ósea) en un tubo.

Añadir 100 µl de la solución A (fijadora) e incubar a temperatura ambiente durante 15 min.

Lavar dos veces en PBS-azida-ASB y centrifugar durante 5 min a 2.000 rpm.

Añadir 100 µl de solución B (agente estabilizador) y la cantidad adecuada de AcMo conjugado con fluorocromo.

Incubar a temperatura ambiente durante 15 min.

Lavar dos veces en PBS-azida-ASB y centrifugar durante 5 min a 2.000 rpm.

Volver a suspender en 0,2-0,5 ml de solución de flujo (p. ej., Isoton).

Leer en un citómetro de flujo.

Detección simultánea de antígenos citoplásmicos/nucleares y de membrana

Método

El primer paso en la detección simultánea de antígenos nucleares y de membrana y citoplásmicos (fig. 14.3) conlleva una inmunotinción para detectar el antígeno de membrana, seguida de la detección del antígeno citoplásmico o nuclear.

Etiquetar los tubos de ensayo con el nombre del paciente, el tipo de muestra, el número de laboratorio y el AcMo.

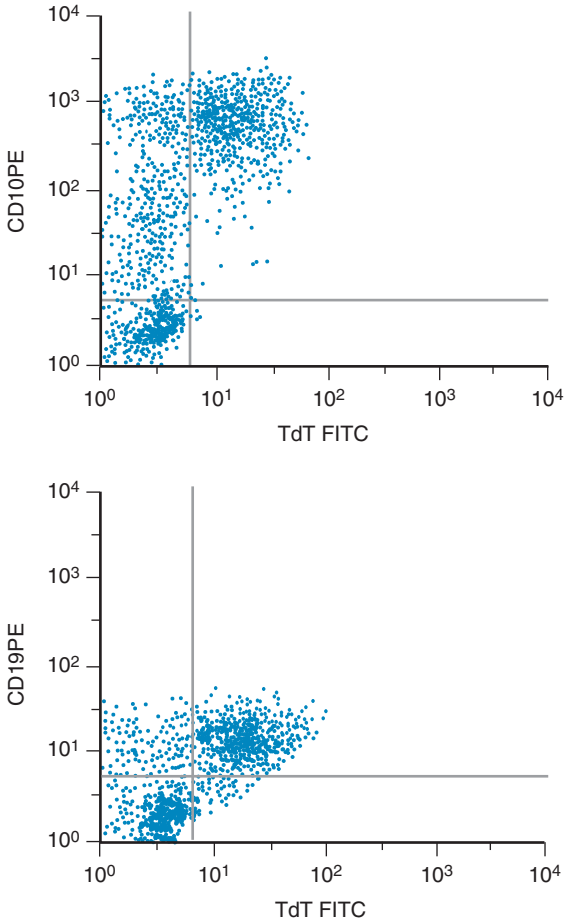


Figura 14.3. Detección simultánea de antígenos nucleares y de membrana. Parte superior: diagrama de puntos que ilustra la coexpresión de CD10 en la membrana celular y el desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) nuclear en la leucemia linfocítica crónica (LLC). Parte inferior: coexpresión del CD19 de membrana y el TdT nuclear en el mismo caso.

Pipetear 100 µl de la muestra (sangre periférica total o médula ósea) en una probeta.

Añadir el AcMo conjugado con el fluorocromo apropiado (por lo general, PE) para detectar el antígeno de membrana.

Incubar a temperatura ambiente durante 15 min.

Añadir 15 µl de la solución A (fijadora) e incubar a temperatura ambiente durante 15 min. Continuar con los pasos descritos previamente.

Añadir 1 ml de PBS-azida-ASB o solución de Hanks, centrifugar durante 5 min a 2.000 rpm y desechar el sobrenadante.

Citometría de flujo multicolor

Los avances en el hardware y en el software de la citometría de flujo y el desarrollo de nuevos fluorocromos han llevado al uso rutinario de la citometría de flujo multicolor y multiparamétrica. Este hecho tiene ventajas sobre las mediciones con doble y triple color en la detección de la enfermedad mínima residual en la leucemia mieloide aguda (LMA) y en la leucemia linfoblástica aguda (LLA) (p. ej., utilizando CD45/CD19/CD10 y TdT), el recuento de la proporción de células clonales en plasma en el mieloma múltiple, y la detección en las células leucémicas de ciertas moléculas que se expresan ampliamente en las células sanguíneas normales (p. ej., ZAP-70 en la leucemia linfocítica crónica).

Cuantificación de los antígenos

La cuantificación se define como la medida de la intensidad de tinción de las células mediante la citometría de flujo, para proporcionar un valor absoluto de la intensidad de la luz que mide[3,4].

La cuantificación de la fluorescencia se realiza comparando la fluorescencia de las células con un estándar externo. Usando diferentes microesferas disponibles en el mercado, es posible, actualmente, medir la cantidad de fluorescencia en relación con el pico de concentración máxima del canal obtenido por citometría de flujo, usando una curva estándar para su cálculo. La cuantificación de la fluorescencia se puede expresar en términos de capacidad fijadora del anticuerpo (CFA) o de moléculas de fluorocromo soluble equivalentes (MFSE).

El método implica tanto la inmunofluorescencia indirecta como la inmunofluorescencia directa. Debido a que esta última es más sencilla, éste es el método que se utiliza normalmente en la práctica rutinaria. Consta de cuatro pasos separados:

1. Elección del equipo de cuantificación.
2. Tinción de las células y las microesferas.
3. Recogida de los datos.
4. Cálculo de los valores de la CFA o de las MFSE.

Hay tres requisitos esenciales para que la cuantificación sea un éxito, que son: *a)* el AcMo tiene que añadirse en cantidades saturantes tanto para las microesferas como para las células de la muestra; *b)* se debe usar el mismo reactivo de la misma firma comercial y a la misma dilución en la prueba y en todas las pruebas posteriores, y *c)* los ajustes del aparato de fluorescencia no deben modificarse una vez hecha la determinación de las microesferas, y el análisis de la muestra no conocida debe realizarse con los mismos ajustes.

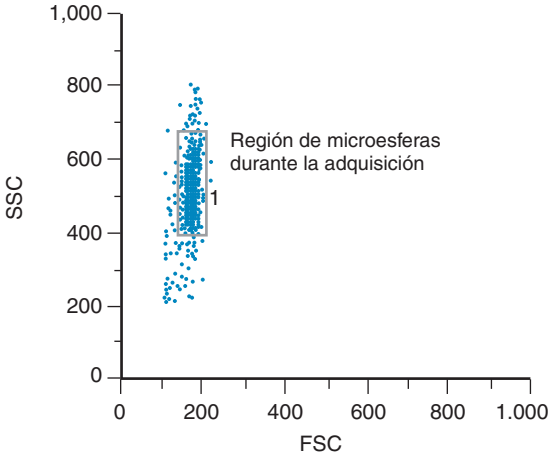
El tipo de microesferas depende del método que se use para la preparación de las muestras. En el mercado existen equipos de microcuentas, que constan generalmente de dos tubos. Uno de ellos contiene cuatro tipos de microesferas con cuatro niveles diferentes de captación de fluorescencia: uno muy tenue, otro muy brillante y dos intermedios. El otro tubo contiene un blanco (p. ej., microesferas sin fluorescencia) (fig. 14.4).

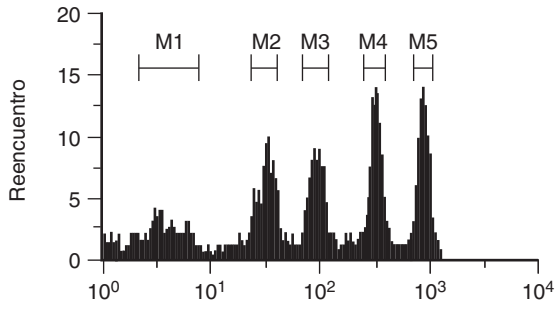
1. Elección del equipo de cuantificación

Inmunofluorescencia directa

Los QSQ (*Quantum Simply Cellular,* Sigma-Aldrich) son microesferas cubiertas con Ig de cabra antirratón que se

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.





Marcador	Izquierda	Derecha	Eventos	% de la región	% Total	Pico	Canal pico
Todos	1,	9.910	1931	100,00	100,00	36	**1**
M1	2,	8	216	11,19	11,19	6	**2**
M2	25,	42	292	15,12	15,12	11	**31**
M3	71,	121	295	15,28	15,28	12	**85**
M4	262,	414	355	18,38	18,38	18	**310**
M5	730,	1.114	340	17,61	17,61	19	**842**

Figura 14.4. Microesferas para la cuantificación de antígenos. Parte superior: Región empleada para la adquisición de microesferas eliminando dobletes. Parte inferior: intensidad de fluorescencia de las microesferas mostrando cinco picos: blanco (M1); tenue (M2); brillante (M5) e intermedio (M3 y M4). SSC, dispersión lateral de la luz; FSC, dispersión frontal de la luz.

usan para cuantificar la inmunofluorescencia directa y para medir la CFA cuando se saturan con el mismo AcMo conjugado con fluorocromo que el usado en la muestra de células. Cada nivel del estándar se puede unir a una cantidad determinada de Ig de ratón. Las microesferas requieren una calibración por separado para cada AcMo.

Inmunofluorescencia indirecta

Los QIFIKIT (Dako Cytomation) son microesferas cubiertas con AcMo que imitan a las células que llevan AcMo. Debido a que estos receptores ligan el anticuerpo secundario usado para la tinción tanto de células como de microesferas, se necesita sólo una calibración por experimento[4].

Inmunofluorescencia directa e indirecta

Los FCSC (microesferas de Quantum) (Bangs Laboratories, Indiana, Estados Unidos) están cubiertos con moléculas conocidas de fluorocromo y están disponibles conjugadas con FITC o PE para medir el MFSE. La fluorescencia de las células se compara con la de las moléculas estándar de fluorocromo.

2. Tinción de las células y de las microesferas

Después de la cuantificación que se ha llevado a cabo con las microesferas, comenzar la tinción de las células mediante uno de los métodos descritos en el siguiente apartado, según el antígeno que se quiera cuantificar. Éste podría ser un antígeno de membrana, nuclear o citoplásmico, o la combinación de dos de ellos.

Inmunofluorescencia directa

Etiquetar un tubo de fondo redondeado de 5 ml con el AcMo que se quiera cuantificar con las microesferas.

Añadir 50 µl de microesferas QSC y 10 µl del AcMo en los tubos adecuados e incubar durante 1 h a 4 °C.

Añadir 2 ml de PBS-azida-ASB en cada tubo y centrifugar durante 5 min a 2.000 rpm. Desechar el sobrenadante y volver a suspender en 250 µl de flujo (p. ej., Isoton).

Inmunofluorescencia indirecta

Etiquetar un tubo de fondo redondeado con las microesferas.

Añadir 100 µl de microesferas y el anticuerpo secundario (Ig antirratón) al tubo con las microesferas y realizar la tinción durante 1 h a 4 °C.

Añadir 2 ml de PBS-azida-ASB a cada tubo y centrifugar durante 5 min a 2.000 rpm. Desechar el sobrenadante y volver a suspender en 250 µl de Isoton.

Inmunofluorescencia directa e indirecta

Etiquetar un tubo de fondo redondeado de 5 ml con las microesferas Quantum.

Añadir 100 µl de microesferas y realizar la tinción durante 1 h a 4 °C.

Añadir entonces 2 ml de PBS-azida-ASB a cada tubo y centrifugar durante 5 min a 2.000 rpm.

Desechar el sobrenadante y volver a suspender en 250 µl de flujo (p. ej., Isoton).

3. Recogida de los datos

El primer paso conlleva la recogida de datos relativos a las microesferas en un citómetro de flujo. Los datos de un único tubo de ensayo con microesferas son suficientes para la cuantificación con las microesferas FCSC Quantum y QIFIKIT. Con el QSC, donde se usa un tubo de ensayo para cada AcMo, el tubo con las microesferas de un AcMo en concreto se debe medir en primer lugar, seguido de todos los tubos de ensayo relevantes con las microesferas para cada AcMo diferente.

Para llevar las microesferas al diagrama de puntos de la FSC/SSC, el voltaje de la SSC debe reducirse más que para las células. Puede haber algunos dobletes si no se agita el tubo de ensayo vigorosamente, y éstos se excluyen creando una región muy ajustada alrededor de las microesferas y recogiendo los datos sólo de aquellas microesferas que se encuentran en esta región. Los aparatos deben ajustarse de manera que la señal fluorescente del tubo de ensayo con la

cuenta blanco (sin etiquetar) se localice en la región entre 0 y 10^1, y se vean otros cuatro picos de fluorescencia a lo largo del eje del fluorocromo relevante. Cuando se establece el voltaje de la fluorescencia, se deben mantener los ajustes durante el resto del análisis de las muestras no conocidas. Con el QSC se deben usar los ajustes apropiados para cada AcMo en concreto.

Se obtienen entonces los datos de las muestras. Con el FSC Quantum Cellular y con el QIFIKIT sólo se necesita un juego de microesferas porque se puede usar la misma curva de referencia estándar para cuantificar los diferentes AcMo (p. ej., CD5, CD19, CD4 y CD8). Con el QSC se tiñe un lote de microesferas de inmunofluorescencia por cada AcMo. Las muestras de un AcMo en particular se deben estudiar con los ajustes de fluorescencia obtenidos de las microesferas teñidas con el correspondiente AcMo, de forma que se obtenga una curva de fluorescencia estándar para cada AcMo. Por tanto, se necesita una curva con las microesferas teñidas con CD5 para todas las muestras teñidas con CD5; se necesita una curva con las microesferas teñidas con CD19 para todas las muestras teñidas con CD19, y así sucesivamente.

4. Cuantificación: cálculo de los valores de la CFA o de la MFSE

Los equipos de cuantificación suministran el programa informático necesario. Estos programas son sencillos y tienen en cuenta la fabricación del aparato, el voltaje usado para la muestra, el fluorocromo utilizado y la fuente de AcMo. Cuando se introducen los datos obtenidos con el citómetro de flujo se genera automáticamente una curva estándar. La curva de calibración estándar se genera cuando se introducen en el programa los valores de los canales del pico del blanco y de los otros cuatro picos obtenidos con el citómetro de flujo. Se introduce también en el programa el número conocido de moléculas de fluorocromo obtenido del proveedor de microesferas. Los valores de los picos para la muestra problema y el de las muestras de control negativo se obtienen haciendo el análisis con la misma calibración de fluorescencia que las microesferas.

Cuando se introduce en el programa el valor del pico obtenido de la muestra, se calcula el valor CFA/MFSE de la muestra no conocida y se guardan los datos. Para la estimación final de la CFA o de la MFSE, a los valores de CFA o de MFSE del tubo control se le restan los valores de la CFA o de la MFSE del marcador.

Inmunocitoquímica

Las técnicas más comunes de inmunocitoquímica son los métodos de la inmunoperoxidasa (IP) y el de la fosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina (FAAFA)[5,6]. Éstos detectan tanto los antígenos intracelulares como los de membrana, previamente a la fijación de la preparación. El método FAAFA es adecuado para utilizarlo en extensiones de sangre o de médula ósea y permite una buena preservación de la morfología celular. La IP es más sencilla que la FAAFA y es útil en el estudio de la madurez o inmadurez de las células linfoides, pero las muestras de médula ósea que contengan células mieloides con peroxidasa endógena pueden dar una reacción de falso positivo a menos que se tomen medidas para inhibir la actividad de dicha peroxidasa endógena. Desafortunadamente, estos procedimientos pueden afectar a la morfología celular y así alterar uno de los propósitos de la prueba.

Inmunoperoxidasa

El método de la IP se puede llevar a cabo con anticuerpos marcados directamente (p. ej., anti-Ig humana conjugada con peroxidasa) o por métodos indirectos usando dos o tres capas. La primera capa es un AcMo (Ig de ratón); la segunda capa es un anticuerpo anti-Ig de ratón conjugado con peroxidasa de rábano; una tercera capa es un complejo de peroxidasa y antiperoxidasa, que se une a la segunda capa y se utiliza para reforzar la reacción. La reacción se completa con el análisis de la presencia de peroxidasa, usando la diaminobencidina (DAB).

Método

Preparar los frotis con citocentrífuga y dejarlos secar durante al menos 6-8 h a temperatura ambiente. Si no se usan inmediatamente, se deben envolver en papel de aluminio y guardarlos a –20 °C. Antes del análisis, el material congelado se debe descongelar a temperatura ambiente durante 30 min. Dibujar un círculo alrededor del área elegida con un lápiz de diamante.

Fijar los portaobjetos en acetona pura durante 10 min. Si se han mantenido a temperatura ambiente durante más de 3 días, fijarlos sólo durante 5 min.

Secar al aire y rodear el área marcada con un anillo de silicona (Dako pen[a] o Sigmacote[b]).

Incubar durante 30 min en una cámara húmeda con 30 µl de AcMo diluido en PBS. Se debe titular la dilución del AcMo en el laboratorio de cada lote de reactivos, utilizando controles positivos y negativos.

Lavar bien con PBS (pH 7,3). Sin dejar que se sequen los portaobjetos, añadir la segunda capa de anticuerpos inmediatamente después del segundo lavado.

Incubar durante 30 min con 30 µl de anticuerpo de conejo anti-Ig de ratón conjugado con peroxidasa (Dako) y diluido al 1:20 en PBS (pH 7,3) con un contenido de un 2% de suero AB humano.

Lavar bien con PBS (pH 7,3) dos veces, como se explica anteriormente.

Incubar durante 30 min en cámara húmeda con 30 µl de anticuerpo de cerdo anticonejo marcado con peroxidasa (Dako) diluido al 1:20 en PBS (pH 7,3) con un contenido de un 2% de suero AB humano.

Lavar bien con PBS (pH 7,3) dos veces, como se explica anteriormente.

Preparar una solución IP con 30 mg de DAB con un 30% de peróxido de hidrógeno en 50 ml de PBS; filtrar y

[a] Dako Cytomation.
[b] Sigma-Aldrich.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

echar en una cubeta acoplada. Sumergir los portaobjetos en esta solución e incubarlos durante 10 min a temperatura ambiente y en la oscuridad.

No hay que olvidar que el sustrato de la peroxidasa (DAB) es carcinogénico y se debe manipular en condiciones de seguridad, usando una campana de extracción y guantes. Un procedimiento alternativo más seguro consiste en diluir los comprimidos de DAB, que están disponibles en el mercado (Dako), en PBS, como se ha explicado previamente.

Enjuagar con agua destilada.
Contrateñir con hematoxilina de Harris durante 10-20 s.
Lavar con agua del grifo durante 2 min.
Quitar el exceso de agua, dejar las extensiones secarse al aire, y montarlas con DPX (dibutilftalato de resina de disterene en xileno).
Para valorar la reactividad del anti-TdT o de cualquier otro anticuerpo policlonal de conejo, se puede realizar una incubación adicional durante 30 min con anticuerpo de ratón anti-Ig de conejo diluido a 1:20 en PBS (pH 7,3) con suero AB humano al 2%, previo a la incubación con el segundo estrato de anticuerpo de conejo anti-Ig de ratón conjugado con peroxidasa.

Interpretación

Con el microscopio óptico, la reacción positiva se ve como un depósito marrón oscuro.

Fosfatasa alcalina antifosfatasa alcalina

El método FAAFA comprende varios pasos que se pueden aplicar a las extensiones de sangre periférica y a las de médula ósea. Las etapas incluyen la incubación con el AcMo, la incubación con el anticuerpo de conejo anti-Ig de ratón y la incubación con los inmunocomplejos del FAAFA. El segundo y tercer paso se pueden repetir para reforzar la reacción.

Método

Hacer extensiones o citocentrifugar los portaobjetos y dejarlos secar durante al menos 6-8 h. Si no se van a usar inmediatamente, envolver los portaobjetos en papel de aluminio y almacenarlos a –20 °C. Si se congelan, descongelarlos a temperatura ambiente durante 30 min antes de realizar el análisis.
Hacer un círculo alrededor del área elegida usando un lápiz de diamante. Si se va a analizar más de un AcMo en el mismo portaobjetos, se pueden hacer varios círculos.
Fijar en acetona pura fría durante 10 min. Si los cortes han estado a temperatura ambiente más de 72 h, fijarlos entonces durante sólo 5 min.
Dejarlos secar al aire.
Cuando se usan extensiones de sangre periférica o de médula ósea, lavar alrededor de las áreas marcadas con el círculo con un bastoncillo de algodón mojado en PBS para eliminar los eritrocitos adyacentes.
Rodear las áreas marcadas con un anillo de silicona (Dako pen o Sigmacote).
Incubar durante 30 min con 30 µl de AcMo diluido en solución salina tamponada con Tris (TBS) 0,05 mol/l, pH 7,6. La dilución apropiada del AcMo se debe determinar titulando cada lote de reactivos, utilizando controles positivos y negativos.
Durante todos los procedimientos siguientes no se deben dejar secar los portaobjetos y se debe realizar la incubación en una cámara húmeda.
Lavar (enjuagar) cuidadosamente con TBS 0,05 mol/l e, inmediatamente después del lavado, añadir 20 µl del segundo estrato, que consiste en conejo anti-Ig de ratón (Dako) diluido en TBS 0,05 mol/l con suero AB humano.
Incubar durante 30 min a temperatura ambiente en una cámara húmeda.
Lavar (enjuagar) otra vez con TBS.
Incubar durante 45 min con 100 µl de complejos FAAFA de ratón (Dako) diluidos a 1:60 en TBS 0,05 mol/l.
Lavar (enjuagar) de nuevo con TBS.
Cubrir los círculos con la solución de desarrollo de FAAFA filtrado durante 15-20 min.
Aclarar con agua destilada.
Contrateñir con hematoxilina de Harris durante 10-20 s.
Lavar con agua del grifo durante 2 min.
Quitar el exceso de agua y montar con Glycergel (Dako) u otro medio de montaje soluble en agua.
No utilizar DPX para cubrir las preparaciones porque la reacción química se desvanecería o negativizaría.

Para estimar la reactividad con anti-TdT o con cualquier otro anticuerpo policlonal de conejo, se puede realizar una incubación adicional con un anticuerpo de ratón anti-Ig de conejo diluido al 1:20 en TBS previamente a la incubación con el segundo estrato.

Tampones

TBS 0,05 M, pH 7,6 (para lavar y diluir el AcMo). Hacer una solución de depósito con 60,57 g de tris-hidroximetil-metilamina en 500 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7,6 con 385 ml de HCl 1 N. Añadir agua destilada hasta 1 l y guardarlo a 4 °C.
Para preparar la solución de trabajo, diluir la solución de depósito a 1:10 en NaCl, 9 g/l.
TBS 0,1 M, pH 8,2 (para diluir el sustrato). Hacer una solución de depósito con 1,21 g de Tris y 80 ml de agua. Ajustar el pH a 8,2 con 4,8 ml de HCl 1 N. Añadir agua hasta llegar a 100 ml (esta solución se puede almacenar durante 1 mes a 4 °C).
Solución de revelado (sustrato). Hay que mezclar, en el siguiente orden: 20 mg de naftol AS-MX fosfato (Sigma-Aldrich), 2 ml de N,N-dimetilformamida (Merck), 98 ml del tampón Tris 0,1 mol/l y 24 mg de levamisol (Sigma-Aldrich).
Guardar en recipiente de plástico a –20 °C en partes alícuotas de 5 ml.
Descongelar inmediatamente antes de usar, añadir 5 mg de sal de rojo rápido TR (Sigma-Aldrich) por vial y filtrar.
En el mercado también se encuentran preparados comerciales de solución de revelado.

Marcadores inmunológicos en la leucemia aguda

Tabla de AcMo útiles para el diagnóstico y la clasificación

Aunque existe un gran número de antígenos reconocibles mediante AcMo en las células hematopoyéticas, por razones prácticas es necesario seleccionar una serie de reactivos bien definidos para el estudio de los casos de leucemia aguda. La serie de reactivos que se describen aquí han sido seleccionados en su mayor parte de acuerdo con las recomendaciones del European Group for the Immunological Classification of Leukaemias (EGIL) y el British Committee for Standards in Haematology[7,8].

Una tabla inicial de AcMo debería ayudar a diferenciar la LMA de la LLA y, más adelante, clasificar la LLA en el linaje de linfocitos B o linfocitos T (tabla 14.1). Esta tabla se constituye así:

1. Marcadores de linfocitos B: CD19, CD10, y CD22 y CD79a citoplasmáticos.
2. Marcadores de linfocitos T: CD2, CD7, y CD3 citoplasmático.
3. Marcadores mieloides: CD13, CD33, CD117 y mieloperoxidasa citoplasmática (anti-MPO).
4. Marcadores no específicos de ningún linaje, que se expresan en células progenitoras hematopoyéticas: CD34, HLA-Dr y TdT.

Dos aspectos que deben tenerse en cuenta son el grado de especificidad de linaje del antígeno y si éste se expresa en la membrana o en el citoplasma. Algunos marcadores son altamente específicos y sensibles para algún linaje en particular (p. ej., CD3 para linfocitos T, CD79a para linfocitos B, y anti-MPO para células mieloides), mientras que otros (p. ej., CD10, CD13 o CD7) son menos específicos de linaje. Sin embargo, estos últimos pueden apoyar el origen linfoide o mieloide en los casos que son negativos para marcadores más específicos o cuando los resultados son equívocos. El segundo aspecto que debe tenerse en cuenta cuando se realiza un inmunofenotipado es que los marcadores más específicos se expresan de manera más precoz tanto en la membrana como en el citoplasma durante la diferenciación celular (p. ej., CD3), sólo son detectables en el citoplasma (p. ej., anti-MPO, CD79a) o ambos casos a la vez[9-11]. Los marcadores contra los precursores hematopoyéticos, tales como TdT o CD34, aunque no son esenciales en la práctica rutinaria, sirven de ayuda cuando aparecen problemas en el diagnóstico diferencial entre las leucemias agudas y los linfomas de células grandes en fase leucémica.

Se necesita una segunda serie de AcMo para clasificar la LLA en los distintos subtipos y para identificar los casos poco frecuentes de LMA derivada de células que implican a los linajes megacariocíticos y eritroides. Esta serie comprende la tinción de Ig citoplasmática y de membrana en la LLA de linaje B; CD1a, CD4, CD5, CD8 y anti-TCR en la LLA de linaje T; y, en la LMA, los anticuerpos que detecten glucoproteínas de membrana presentes en plaquetas y megacariocitos o la glucoforina A expresada por los precursores eritroides[7,12].

La identificación de la reactividad celular con otros AcMo puede incluir CD14, antilisozima y CD36. Aunque CD14 y antilisozima no son específicos de las leucemias agudas monoblásticas, los dos se expresan de manera frecuente durante la diferenciación monocítica. CD36 se expresa generalmente en leucemias eritroides pobremente diferenciadas. Aunque este marcador no es específico de los precursores eritroides, ya que se expresa también en monoblastos y células megacariocíticas, cuando su reactividad se considera junto con la de otros AcMo (p. ej., negativos para el HLA-Dr, AcMo antiplaquetario y CD13/CD33) es altamente indicativa de una leucemia eritroide aguda.

Los AcMo contra células no hematopoyéticas raramente necesitan ser investigados cuando se lleva a cabo el inmunofenotipado para el diagnóstico de leucemias agudas. Sin embargo, algunos casos raros de neuroblastoma o de carcinoma de células en avena pueden imitar a una leucemia aguda en la médula ósea y, en estos casos, los AcMo antineuroblastoma y el marcador CD45 panleucocitario pueden ayudar a establecer un diagnóstico correcto.

Otros marcadores útiles para la caracterización de leucemias aguas, aunque no usados de manera rutinaria, son los siguientes:

Tabla 14.1. Panel de anticuerpos monoclonales para el diagnóstico de las leucemias agudas

	LLA		LMA
	Linaje B	Linaje T	
Primera línea	CD19, CD22, CD79a, CD10[a]	CD7, CD2, ciCD3 TdT, HLA-Dr, CD34	CD13, CD33, CD117, anti-MPO
Segunda línea	cimu[a], IgSm	CD1a, CD5, CD4, CD8, anti-TCR	CD41, CD42, CD61, anti-glucoforina A

[a] CD10 y cimu no son esenciales para el diagnóstico de LLA de linaje B, pero son importantes en los casos pediátricos para identificar la LLA común, la LLA pro-B y la LLA pre-B.
Marcadores opcionales: CD14, antilisozima, CD36.
CD, grupo de diferenciación; ci, citoplasmático; IgSm, inmunoglobulina de superficie; LLA, leucemia linfoblástica aguda; LMA, leucemia mieloide aguda; MPO, mieloperoxidasa; TCR, receptor de linfocitos T; TdT, desoxinucleotidil transferasa terminal.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

1. Un AcMo que reconozca la distribución anómala de la proteína promielocítica (PML) en los casos de LMA-M3 con t(15;17). Aunque la PML se expresa en células mieloides normales y en los blastos de otras LMA diferentes a la M3, el patrón de expresión, por ejemplo, multiparticulado o citoplasmático en los casos con t(15;17), es diferente al de células mieloides normales o de mieloblastos de otros tipos de LMA. Estos últimos o bien son negativos para anti-PML, o bien tienen proteínas que se expresan en grandes cuerpos nucleares. La reactividad con anti-PML necesita valorarse con el microscopio de fluorescencia o con el microscopio óptico con alguna técnica inmunocitoquímica[13,14].
2. Los AcMo 7,1/NG2 y NG1 que se expresan principalmente en el subgrupo de LLA de células pro-B o de células B tempranas con una reorganización[15] 11q23 y en un porcentaje de LMA con signos de diferenciación monocítica (con independencia de la presencia de la reorganización 11q23)[16-18].
3. El AcMo CD56 para identificar los casos poco frecuentes de leucemia de células blásticas/asesinas naturales (NK) agresivas en casos sin evidencia de compromiso mieloide o linfoide con marcadores celulares específicos.

Clasificación inmunológica de las leucemias agudas

Hay dos grandes linajes de diferenciación en el sistema linfoide, B y T, y las leucemias linfoblásticas provienen de precursores de linfocitos B o T. La tabla 14.2 ilustra que sólo unos pocos AcMo reaccionan positivamente con los linfoblastos más inmaduros; sin embargo, con la maduración, hay más AcMo que se vuelven reactivos. Así, para demostrar todos los casos de leucemia de un linaje particular, es importante incluir siempre en la batería de AcMo aquellos que detectarán las células más inmaduras. La LLA de linaje B está definida por la expresión de al menos dos antígenos de linfocitos B, CD79a, CD19 y/o CD22; la LLA de linaje T se define por la expresión de TdT nuclear y CD3. El CD7 es también constantemente positivo en las LLA-T. Sin embargo, la expresión de CD7 no define por sí misma la LLA-T ya que este AcMo es positivo en alrededor del 20% de los casos de LMA.

La LLA de linaje B y T puede ser posteriormente subclasificada según la diferenciación celular o su maduración (v. tabla 14.2). Aunque esta subclasificación no es esencial para el diagnóstico, es importante debido a la correlación entre ciertos subtipos de linaje B y las características moleculares, citogenéticas y clínicas.

La LLA de linaje B se puede clasificar en cuatro subtipos: LLA pro-B (previamente denominada LLA nula), LLA común (v. fig. 14.3), LLA pre-B y LLA de linfocitos B maduros (v. tabla 14.2). Hay cierta correlación entre estos subtipos inmunológicos y la genética molecular y el pronóstico. La mayoría de LLA infantil con t(4;11)(q21;q23) y/o reorganización del gen de la LLM en el 11q23 son LLA pro-B y a menudo expresan CD15, mientras que el fenotipo de LLA común se asocia con hiperdiploidía o t(12;21) implicando el gen *TEL*, ambas asociadas con un buen pronóstico. La t(1;19)(q23;p13) es más común en el subgrupo de LLA pre-B. Las «LLA de linfocitos B maduros» (LLA L3) no están clasificadas como LLA en la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), pero se incluye dentro del grupo de los linfomas no Hodgkin de alto grado porque corresponde a la manifestación leucémica del linfoma de Burkitt[19].

La LLA de linaje T se puede también subdividir en varios grupos según el estado de diferenciación de los linfoblastos. En la forma más inmadura de LLA pro-T, los blastos sólo expresan CD7 y CD3 citoplasmático; en la LLA pre-T también existe expresión de CD2 o de CD5; la LLA-T cortical viene definida por la expresión de CD1a; y en la rara LLA-T madura, los blastos expresan CD3 tanto de membrana como citoplasmático (v. tabla 14.2). Los antígenos asociados a linfocitos T, tales como CD2, CD5, CD4, CD8 y TCR se expresan con frecuencia variable en la LLA-T cortical y madura; por ejemplo, la coexpresión de CD4 y CD8, una característica fenotípica de los timocitos corticales normales, es habitual en la LLA-T cortical. Además, la LLA-T madura puede subclasificarse en dos subgrupos, según la expresión en la membrana de moléculas del complejo del receptor de linfocitos T (TCR): αβ o γδ.

Tabla 14.2. Clasificación inmunológica de las leucemias agudas

Leucemias linfoblásticas agudas (LLA) (TdT+)
Precursores de linfocitos B (CD19+ y/o CD79a+ y/o CD22+)
LLA pro-B (sin expresión de otros marcadores de linfocitos B)
LLA común (CD10+, IgM citoplasmática –)
LLA pre-B (IgM citoplasmática +)
LLA de linfocitos B maduros[a] (Ig de superficie +)
Precursores de linfocitos T (CD3 citoplasmático+, CD7+)[b]
LLA pro-T (sin expresión de otros marcadores de linfocitos T)
LLA pre-T (CD2+ y/o CD5+)
LLA de linfocitos T corticales (CD1a+)
LLA de linfocitos T maduros (CD3 de membrana +)
Leucemias mieloides agudas (LMA)
LMA (M0–M5) (anti-MPO+ y/o CD13+, y/o CD33+ y/o CD117+)
Leucemia eritroide pura (antiglucoforina A+, antígeno anti-grupo sanguíneo +, CD36+)
Leucemias megacarioblásticas (CD41+, CD42+, CD61+)
Varios
Leucemias agudas bifenotípicas (coexpresión de marcadores mieloides y linfoides)[c]
LLA positiva para antígenos mieloides
LMA positiva para antígenos linfoides
Leucemias de células dendríticas
Leucemias de células asesinas naturales (NK) blásticas

[a] La LLA de linfocitos B maduros de la clasificación Francesa -Americana-Británica es típicamente TdT negativa.
[b] CD4 y CD8 se expresan de manera variable.
[c] Las puntuaciones para la leucemia aguda bifenotípica se describen en la tabla 14.3.
Ig, inmunoglobulina; MPO, mieloperoxidasa; TdT, desoxinucleotidil transferasa terminal.

La LMA se puede definir inmunológicamente por la expresión de dos o más marcadores mieloides: CD13, CD33, CD117 y anti-MPO en ausencia de marcadores linfoides[7]. El marcador más específico para el linaje mieloide es el anti-MPO, seguido por el CD117; por norma, ambos serán negativos en la LLA[20]. No existe ningún marcador que permita distinguir entre los diversos subtipos de LMA de la clasificación Francesa-Americana-Británica (FAB)[21]. Sin embargo, algunos AcMo pueden ser especialmente positivos en ciertos subtipos de LMA, tales como CD14 o antilisozima en casos de diferenciación monocítica, la ausencia de expresión de HLA-Dr en LMA M3, o la expresión de CD19 en la LMA M2. Además, los marcadores inmunológicos son esenciales para el diagnóstico de leucemias mieloides de baja diferenciación o LMA M0, en las cuales los blastos no muestran características mieloides en la morfología o en la citoquímica[22,23].

En leucemias de bajo grado de diferenciación, en las que el primer panel de marcadores linfoides y mieloides no muestra resultados positivos, se deben analizar los AcMo contra las glucoproteínas plaquetarias Ib, el complejo IIb/IIIa y IIIa (p. ej., CD41, CD42 y CD61) para confirmar o excluir el diagnóstico de leucemia megacarioblástica aguda[7,12], y se deben utilizar AcMo para glicoforina A o para los grupos de eritrocitos, como el Gerbich, para confirmar o excluir las leucemias eritroides.

El inmunofenotipado permite el reconocimiento de una forma poco habitual de leucemia aguda denominada leucemia aguda bifenotípica o leucemia aguda de linaje mixto. Esta leucemia supone el 5% de los casos y se caracteriza por la coexpresión de una constelación de antígenos mieloides y linfoides en las células blásticas (tabla 14.3). La falta de acuerdo entre los diversos autores en la definición de leucemia bifenotípica ha hecho difícil establecer si constituye una entidad clinicopatológica distinta. Hemos descrito un sistema de puntuación[24,25], adoptado del grupo EGIL con algunas modificaciones[7], que pretende distinguir las leucemias agudas bifenotípicas de los casos de LLA o LMA con una expresión aberrante de un marcador de otro linaje. Esta puntuación se basa en el número y en la especificidad de linaje de los marcadores linfoides y mieloides expresados por las células blásticas, y ha sido modificada y aceptada por la OMS[26]. Los marcadores más específicos obtienen una puntuación de 2: por ejemplo, CD3 para el linaje de linfocitos T, CD79a, Ig y CD22 para el linaje de linfocitos B, y MPO para el linaje mieloide[7,24-26].

El origen de las células leucémicas en las leucemias agudas bifenotípicas se desconoce. De hecho, la OMS considera estas leucemias, junto con las leucemias agudas indiferenciadas, bajo el grupo de las leucemias agudas de linaje ambiguo[26].

Además de la LLA y la LMA, hay tipos extremadamente poco frecuentes de leucemias agudas que, no obstante, se identifican cada vez más. Éstos comprenden las leucemias derivadas de células dendríticas, en cuyas células se expresan CD56, CD4, CD123, HLA-Dr y CD68[27], y leucemias de células NK agresivas[28].

Tabla 14.3. Sistema de puntuación para el diagnóstico de las leucemias agudas bifenotípicas[a]

Puntuación	Linfoide B	Linfoide T	Mieloide
2	CD79a CD22ci IgMci	CD3 anti-TCR αβ anti-TCR γδ	anti-MPO
1	CD19 CD20 CD10	CD2 CD5 CD8 CD10	CD117 CD13 CD33 CD65
0,5	TdT CD24	TdT CD7	CD14 CD15

[a] La leucemia aguda bifenotípica se define cuando la puntuación para los linajes mieloides y uno de los linfoides es >2 puntos. Cada marcador puntúa su correspondiente valor. Los casos de LLA y LMA con la expresión de marcadores mieloides y linfoides, respectivamente, pero con puntuación menor de 2,5 se han descrito como LLA con antígenos mieloides + y LMA con antígenos linfoides +. Al contrario que en las leucemias agudas bifenotípicas, no parecen ser diferentes de las LLA o LMA sin expresión antigénica aberrante. en cuanto a su genética o su pronóstico.

MPO, mieloperoxidasa; TCR, receptor de linfocitos T; TdT, desoxinucleotidil transferasa terminal.

Marcadores inmunológicos en trastornos linfoproliferativos crónicos

El inmunofenotipado es esencial para el diagnóstico y la caracterización de trastornos linfoproliferativos. Los marcadores inmunológicos permiten distinguir las leucemias linfoblásticas y los linfomas linfoblásticos, que son TdT positivos, de las enfermedades linfoides crónicas o maduras, las cuales son constantemente TdT negativas.

El inmunofenotipado también pone de manifiesto si las células malignas son de naturaleza linfoide B o T y demuestra la clonalidad en los casos de linfocitos B. Los marcadores pueden ser también útiles para confirmar o establecer el diagnóstico de ciertas entidades que muestran distintos perfiles, inmunológicos y de otros tipos, que pueden proporcionar información sobre el pronóstico.

Panel de AcMo para el diagnóstico y la clasificación

El diagnóstico de trastornos de los linfocitos B o T requiere una pequeña batería de AcMo. Es conveniente usar un procedimiento de dos pasos, con un panel inicial aplicable a todos los casos y un segundo panel basado en los resultados del primero y un diagnóstico provisional según las características clínicas y/o la morfología celular (tabla 14.4)[8,29].

El primer panel de marcadores pretende distinguir entre trastornos de linfocitos B y T, demostrar la clonalidad de los linfocitos B, confirmar el diagnóstico de la LLC y confirmar o excluir una neoplasia de linfocitos B no LLC. Esto incluye una inmunotinción con antikappa y antilambda, CD2 (marcadores de linfocitos T), CD5 (como un marcador de linfocitos T y de un subgrupo de linfocitos B), y cuatro AcMo que detectan antígenos en el subgrupo de linfocitos B: CD23, FMC7, CD79b contra la cadena β del receptor de

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 14.4. Panel de los anticuerpos monoclonales para el diagnóstico de los trastornos linfoides

	Linfocitos B	Linfocitos T
Primera línea	IgSm (kappa/lambda), CD19, CD23, FMC7 CD79bm, CD22m, CD5[a]	CD2, CD5[a]
Segunda línea	CD11c, CD25, CD103, CD123, CD38, CD138, IgCi	CD3, CD4, CD7, CD8

[a] Marcador de linfocitos T y del subgrupo de linfocitos B.
Marcadores opcionales: CD25, CD79a y asociados a las células asesinas naturales (NK) (p. ej., CD16, CD56, CD57 y CD11b).
IgCi, inmunoglobulina citoplásmica; IgSm, inmunoglobulina de superficie.

linfocitos B y CD22 de membrana. Con estos dos últimos reactivos, así como con la Ig de superficie, es importante evaluar la intensidad de la fluorescencia para distinguir entre la LLC y otras alteraciones de los linfocitos B (fig. 14.5). Los resultados obtenidos con esta serie de AcMo se pueden combinar en un sistema de puntuación (tabla 14.5) para establecer el diagnóstico de LLC y para distinguir casos de LLC con una morfología atípica y de LLC con un número aumentado de prolinfocitos (LLC/PL) de otras enfermedades de linfocitos B como la leucemia prolinfocítica de linfocitos B (LPL-B) y los linfomas de linfocitos B en fase leucémica[29]. El perfil característico de una LLC es una inmunoglobulina de superficie débil (IgSm), CD5+, CD23+, FMC7– y CD79b y CD22 débiles o negativos[29-32]. El FMC7 ha demostrado que reconoce un epítopo de CD20, y se ha sugerido que este marcador podría reemplazarse por CD20 en el sistema de puntuación de diagnóstico para la LLC. Sin embargo, los datos muestran que el cambio de FMC7 por CD20 da como resultado una disminución en la sensibilidad de la puntuación porque la mayoría de los casos de LLC expresan CD20 de una manera débil[33]. Aun así, aunque CD20 no es particularmente útil para el diagnóstico, se debe incorporar al panel de marcadores de trastornos linfoides crónicos porque se usa cada vez más como herramienta terapéutica en estas enfermedades.

Si, utilizando el panel de AcMo de primera línea, el perfil del marcador presenta un fenotipo de linfocito B que no es típico de la LLC, se puede usar un segundo panel de AcMo. Éste se selecciona según la revisión de la morfología celular, la información clínica o las características de laboratorio. Por ejemplo, la estimación de la reactividad celular con cuatro AcMo (CD11c, CD25, CD103 y HC2) es útil para distinguir una leucemia de células peludas o tricoleucemia (LCP) de otros trastornos con células vellosas circulantes, que se pueden confundir con una LCP, como el LELV (linfoma esplénico con linfocitos vellosos), también conocido como linfoma de la zona esplénica marginal o linfoma de zona marginal, y la variante de LCP. Las células de la mayoría de los casos de LCP coexpresan los tres o cuatro marcadores mencionados previamente, mientras que la LELV y las células de la variante de LCP son positivas para uno o, como mucho, dos de esos marcadores[34]. Más recientemente, otro AcMo, CD123, que reconoce la cadena β del receptor de la interleucina 3, ha demostrado ser útil para distinguir la LCP de la LELV y la forma variante de LCP. CD123 se expresa siempre en las células LCP, mientras que es negativo en los otros dos trastornos[35]. Por tanto, CD123 podría reemplazar a HC2 en un panel de estudio rutinario, porque este último AcMo no se encuentra en el mercado.

Cuando el panel de primera línea de marcadores sugiere un fenotipo de linfocitos T (CD2+, CD5+/–), se debe investigar la expresión de otros marcadores de linfocitos T, tales como CD3, CD7, CD4 y CD8. CD25 puede usarse en los casos en los que se sospeche linfoma/leucemia de linfocitos T del adulto. Cuando los marcadores no indiquen ni linaje B ni T, debería considerarse un análisis de marcadores de células NK.

Pueden darse situaciones poco habituales en el caso de leucemia de células plasmáticas, en la que las células son negativas para todos los marcadores de linfocitos T y para la mayoría de linfocitos B, incluyendo la expresión de Ig de superficie; las células sólo expresan Ig en el citoplasma (con restricción de la cadena ligera) y son positivas para CD38 y CD138, y negativas para CD45. En esta situación es útil una tinción para citometría de triple flujo utilizando CD45, CD38 y cadenas ligeras de Ig citoplasmática. Las células plasmáticas normales y malignas pueden expresar también CD79a, un epítopo citoplasmático de la cadena α del receptor de linfocitos B.

Otros marcadores con valor diagnóstico y pronóstico en los trastornos linfoides crónicos son los siguientes:

Anticiclina D1

Los AcMo que detectan la ciclina D1 se expresan principalmente en las células del linfoma de células del manto (LCM) y en otros casos de linfoma en los que las células llevan la t(11;14)(q13;32)[36,37]. Estos anticuerpos se usan principalmente en secciones tisulares en inmunohistoquímica o en preparaciones de citocentrífuga con inmunocitoquímica, aunque también es posible estimar la expresión de ciclina D1 mediante citometría de flujo con el AcMo 5D4 tras la estabilización y fijación de las células. La sensibilidad y especificidad de la tinción de la ciclina D1 mediante cito-

Tabla 14.5. Sistema de puntuación para el diagnóstico de leucemia linfocítica crónica (LLC)[a]

Marcador	Puntos	
	1	0
CD5	Positivo	Negativo
CD23	Positivo	Negativo
FMC7	Negativo	Positivo
IgSm[b]	Débil	Moderado/fuerte
CD22/CD79b[b]	Débil/negativo	Moderado/fuerte

[a] La puntuación para la LLC varía de 3 a 5, mientras que en los otros trastornos de linfocitos B varía de 0 a 2.
[b] Expresión de membrana.

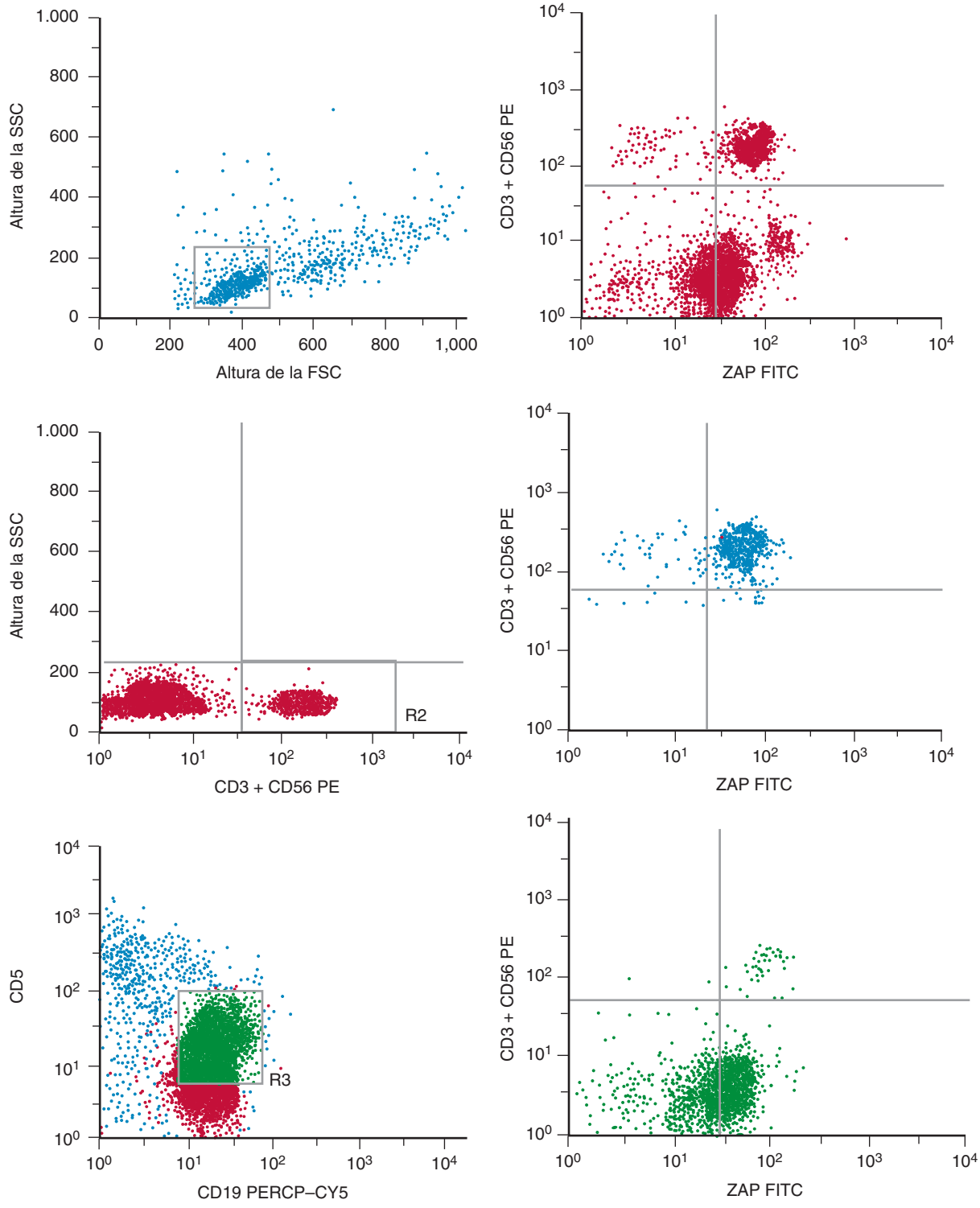


Figura 14.5. Diagrama de puntos de citometría de flujo utilizando un método de cuatro colores para detectar la expresión de ZAP-70 en linfocitos NK/T y linfocitos de la leucemia linfocítica crónica (LLC). Puntos de la parte superior: región de la población linfocítica completa (izquierda) y la expresión de ZAP-70 (derecha). Puntos intermedios: región de las células CD3/CD56 positivas, que representan linfocitos T y asesinas naturales (NK) (izquierda) y la expresión de ZAP-70 en esta población (derecha). Puntos de la parte inferior: región de las células CD5/CD19 positivas (células LLC) *(izquierda)* y la expresión de ZAP-70 en este subgrupo *(derecha)*.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

metría de flujo es alrededor del 80%, y por tanto se debe considerar este marcado por citometría de flujo en el proceso diagnóstico cuando se necesita descartar un linfoma de células del manto[38].

Proteína p53

El marcador de la proteína p53 puede detectarse en las células mediante inmunocitoquímica o citometría de flujo con anticuerpos específicos. Hay una buena correlación entre la expresión del p53 y las deleciones o mutaciones puntuales del gen *TP53*. Parece, por tanto, que no es necesario hacer la secuenciación genética de manera rutinaria porque la citometría de flujo, la fluorescencia de hibridación *in situ* (FISH), o ambas, proporcionan una información precisa acerca de la situación del p53[39]. Aunque no es esencial para el diagnóstico, esta prueba puede ser útil como un indicador pronóstico, debido a su correlación con la resistencia al tratamiento y la progresión de la enfermedad en pacientes con LLC, LLP-B y otros trastornos de linfocitos B[40,41].

Expresión de CD38 y de ZAP-70

CD38 y ZAP-70 son dos marcadores que han demostrado tener un gran impacto pronóstico en la LLC. La expresión de CD38 ha surgido como un factor pronóstico independiente del estado mutacional de la cadena pesada de la inmunoglobulina (IgVH)[42]. Hay que valorar CD38 mediante el método de citometría de flujo de triple color para asegurar que la expresión se evalúa en las células leucémicas. Aunque los primeros informes utilizaban umbrales del 20-30% de células CD38+ para considerar positivo este marcador, se ha visto que existe una diversidad intraclonal y que el umbral del 7% es el más fiable e informativo en términos de pronóstico[43]. ZAP-70 codifica una tirosinacinasa, que se expresa en los linfocitos T normales, las células NK y en algunos linfocitos B. Los estudios de micromatrices en la LLC han demostrado que el patrón de expresión de genes es muy similar en los casos de genes IgVH mutados o no mutados, con diferencias mínimas en unos pocos genes. Entre éstos, el ZAP-70 se expresa principalmente en los casos de IgVH no mutada; por tanto, se sugirió que el ZAP-70 podría ser un marcador que sustituyera el estudio del estado mutacional. En este sentido, es importante estimar su expresión en células de LLC-B purificadas mediante análisis de ARN o mediante el método de la citometría de cuádruple flujo, que permite la valoración de la expresión de ZAP-70 en los linfocitos T, NK y de la LLC (fig. 14.5)[44]. En la actualidad se desconoce cuál es el mejor umbral (10% o 20%) para células de LLC ZAP-70+ para considerar que este marcador sea positivo.

AcMo contra las regiones variables del TCR β

Hay una serie de AcMo que identifican a los linfocitos T que expresan las diversas regiones variables del TCR β y que, por tanto, podrían ser útiles para demostrar la clonalidad de la población de linfocitos T, particularmente en aquellos casos de linfocitosis de linfocitos grandes granulares (LGG), en las que no se pueden llevar a cabo estudios moleculares (p. ej., reacción en cadena de la polimerasa) de manera sencilla. También tendría un papel potencial a la hora de identificar clones de linfocitos B en pacientes con hipereosinofilia.

AcMo contra CD20 y CD52 (Campath-1H)

La expresión de los anticuerpos CD20 y CD52 se debe valorar en aquellos pacientes en los que se contempla la terapia con dichos anticuerpos.

Perfiles inmunológicos de los trastornos linfoproliferativos crónicos

Los inmunofenotipos más comunes de los trastornos de linfocitos B y T se muestran en las tablas 14.6 y 14.7. La LLC tiene un fenotipo que distingue claramente esta enfermedad de otras leucemias de linfocitos B. En cambio, existe una superposición en la expresión de los marcadores de otras en-

Tabla 14.6. Marcadores de membrana en los trastornos de los linfocitos B maduros (CD2–)

Enfermedad	IgSm	CD5	CD23	FMC7	CD22	CD79b
LLC	Débil	++	++	–/+	Débil/–	Débil/–
LPL-B	Intenso	–/+	–	++	+	++
LPC	Intenso	–	–	++	++	+
LPC-variante	Intenso	–	–	++	++	+
LELV	Intenso	–/+	–/+	++	++	++
LF	Intenso	–/+	–/+	++	++	++
Manto	Intenso	++	–	++	++	++
Células grandes	Intenso	–/+	–/+	++	++	++
LCPI[a]	Negativo	–	–	–	–	–

[a] Expresan inmunoglobulina citoplásmica (restingido a cadena ligera), CD38, CD79a y, con una frecuencia variable, otros marcadores de linfocitos B. Puntuación: (–): negativo o positivo en menos del 10% de los casos; (–/+): positivo en el 10-25% de los casos; (+): positivo en el 25–75% de los casos; y (++): positivo en más del 75% de los casos.
IgSm, inmunoglobulina de superficie; LCP, leucemia de células peludas; LCPI, leucemia de células plasmáticas; LELV, linfoma esplénico con linfocitos vellosos; LF, linfoma folicular; LLC, leucemia linfocítica crónica; LPL-B, leucemia prolinfocitos B.

Tabla 14.7. Marcadores inmunológicos en los trastornos de linfocitos T maduros (CD2+)

Marcadores	LPL-T	Leucemia LGG[a]	LLTA	SS	T-LNH
CD3	++	++	++	++	+
CD7	++	+	–/+	+	+
CD4+, CD8–	+	–	++	++	+
CD4+, CD8+	–/+	–	–	–	+
CD4–, CD8+	–/+	++	–	–	+
CD4–, CD8–	–	–/+	–	–	+

[a] Un porcentaje de casos son CD3 negativos y tienen un fenotipo de asesina natural (NK): CD56+, CD16+. Puntuación: (–): negativo o positivo en menos del 10% de los casos; (–/+): positivo en el 10–25% de los casos; (+): positivo en el 25-75% de los casos, y (++): positivo en más del 75% de los casos.

LGG, linfocitos granulares grandes; LLTA, linfoma/leucemia de linfocitos T del adulto; LNH-T, linfoma postímico de linfocitos T; LPL-T, leucemia prolinfocítica de linfocitos T; SS, síndrome de Sézary.

fermedades malignas de linfocitos B; por esta razón, en los casos con un perfil de marcadores de linfocitos B diferente de la LLC, se necesita interpretar el análisis inmunofenotípico a la luz de la morfología o de otra información clínica o de laboratorio para establecer un diagnóstico preciso.

No existe un perfil inmunológico específico que distinga a las diferentes enfermedades de linfocitos T (v. tabla 14.7). Sin embargo, la expresión de CD8, con o sin marcadores asociados de NK como CD16 o CD56, es característica de la leucemia linfocítica granular de linfocitos T grandes (LGG), mientras que dicha expresión apenas se encuentra en otros trastornos[45]. Por el contrario, la coexpresión de CD4 y CD8 se ve casi exclusivamente en un subgrupo, aproximadamente del 25%, de la leucemia prolinfocítica de linfocitos T (LPL-T) (v. tabla 14.7)[46]. Otros marcadores también se pueden expresar de manera diferenciada en varias enfermedades malignas de linfocitos T. Así, por ejemplo, hay expresión de CD25 en el linfoma/leucemia de linfocitos T del adulto (LLTA); hay alta reactividad con el CD7 en LLP-T[45,47], y expresión de granzima B, TIA-1 o perforinas en las leucemias LGG de linfocitos T o de NK, y TCR γδ en el linfoma de linfocitos T hepatosplénico[45].

Marcadores inmunológicos para la detección de la enfermedad mínima residual

El inmunofenotipado puede ser una herramienta útil para la detección de pequeñas cantidades de células leucémicas residuales en muestras de sangre periférica o de médula ósea, cuando estas células no se detectan por morfología o histopatología estándar. Esto se puede llevar a cabo mediante métodos de inmunofluorescencia de doble o triple color con una combinación de AcMo destinados a identificar fenotipos «aberrantes» que no están presentes en las células hematopoyéticas normales o a cuantificar antígenos que se expresan en diferentes densidades de células normales y leucémicas[48,49]. Por ejemplo, aunque la médula ósea normal, especialmente en niños o cuando está regenerándose tras la terapia, tiene una población menor de células con un fenotipo precursor de célula B (p. ej., TdT+,

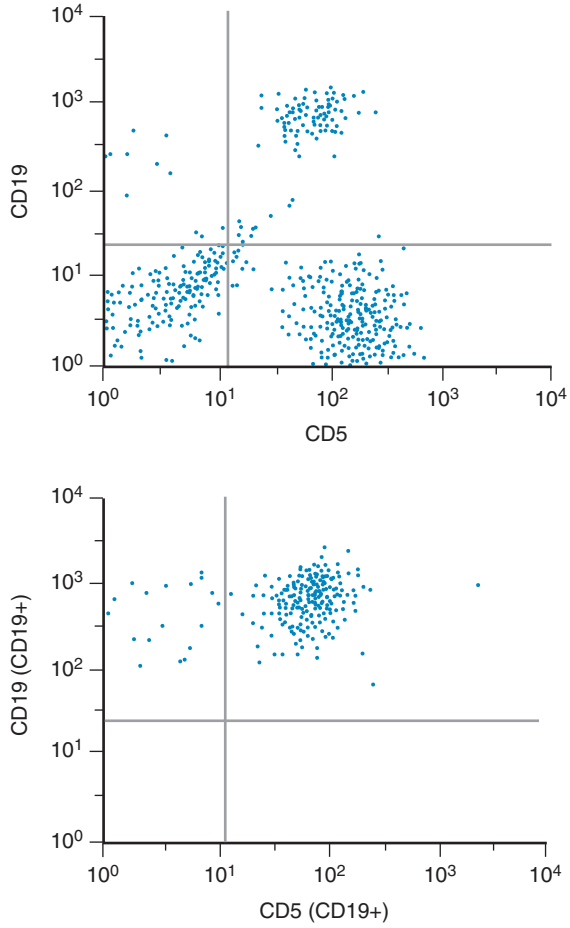


Figura 14.6. Detección de enfermedad mínima residual. Parte superior: diagrama de puntos que muestra una pequeña proporción de linfocitos que coexpresan CD5 y CD19 en un paciente con leucemia linfocítica crónica en tratamiento; la mayoría de los linfocitos son linfocitos T (CD5+, CD19–). Parte inferior: diagrama de puntos que muestra el enriquecimiento de la población de CD5+ y CD19+ adquiridos en una región para las células CD19+ en la imagen superior.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

CD10+, CD19+), similar al de los blastos de las LLA, ciertos estudios cuantitativos permiten discriminar entre los precursores normales (TdT fuerte y CD10 y CD19 débiles) y los blastos de la LLA (TdT débil, CD10/CD19 fuertes)[48,49]. De manera similar, hay una pequeña población de linfocitos B en la sangre normal y en la médula ósea que coexpresa CD5, un fenotipo característico de la LLC. Sin embargo, al estimar la proporción de células CD5+ dentro de la totalidad de la población de linfocitos B (CD19+), es posible demostrar si las células corresponden a una leucemia residual o son linfocitos B normales (fig. 14.6)[50]. Más recientemente, la citometría de flujo cuádruple marcado usando CD79b, CD20, CD5 y CD19 ha demostrado ser extremadamente sensible para la detección de células residuales de LLC[51]. En los cortes de tejido de médula ósea, se pueden poner de manifiesto células leucémicas residuales anormales de forma ocasional, y reconocerlas fácilmente usando técnicas inmunohistoquímicas con marcadores conocidos por reaccionar con las células leucémicas (p. ej., DBA44 o CD103) en la LCP[52]. La detección de EMR se aplica tanto para las leucemias linfoides agudas como para las crónicas, y es probable que tenga una importancia pronóstica en términos de probabilidad de recaída.

Es esencial identificar cualquier aberración fenotípica presente en el diagnóstico en cada paciente en concreto, así como buscar la misma aberración asociada a la leucemia durante el seguimiento.

SIGLAS UTILIZADAS EN ESTE CAPÍTULO

AcMo:	anticuerpo monoclonal.
ASB:	albúmina sérica bovina.
CD:	grupo de diferenciación.
CFA:	capacidad fijadora de anticuerpo.
Ci:	citoplasmático.
DAB:	diaminobenzidina.
EGIL:	Grupo Europeo de Clasificación Inmunológica de las Leucemias.
EMR:	enfermedad mínima residual.
FAAFA:	fosfatasa alcalina antifosfatasa alcalina.
FITC:	isotiocianato de fluoresceína.
FSC:	dispersión de la luz hacia delante.
Ig:	inmunoglobulina.
IgSm:	inmunoglobulina de superficie de membrana.
IP:	inmunoperoxidasa.
LCP:	leucemia de células peludas.
LCPl:	leucemia de células plasmáticas.
LELV:	linfoma esplénico con linfocitos vellosos.
LF:	linfoma folicular.
LGG:	linfocito granular grande.
LLA:	leucemia linfoblástica aguda.
LLC/PL:	leucemia linfocítica crónica con prolinfocitos aumentados.
LLC:	leucemia linfocítica crónica.
LLTA:	linfoma/leucemia de linfocitos T del adulto.
LNH:	linfoma no Hodgkin.
LPL-B:	leucemia prolinfocítica de linfocitos B.
LPL-T:	leucemia prolinfocítica de linfocitos T.
MFSE:	moléculas de fluorocromo soluble equivalente.
MPO:	mieloperoxidasa.
PBS-azida-ASB:	PBS con azida sódica y albúmina de suero bovino.
PE:	ficoeritrina.
PML:	proteína codificada por el gen *PML*.
QSC:	*Quantum simply cellular*.
SS:	síndrome de Sézary.
SSC:	dispersión lateral de la luz.
TBS:	Tris salino tamponado.
TCR:	receptor de linfocitos T.
TdT:	desoxinucleotidil transferasa terminal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Groeneveld K, Temarvelde JG, van den Beemd MWM, et al 1996 Flow cytometry detection of intracellular antigens for immunophenotyping of normal and malignant leukocytes. BTS Technical Report. Leukemia 10:1383–1389.
2. Pizzolo G, Vincenzi C, Nadali G, et al 1995 Detection of membrane and intracellular antigens by flow cytometry following ORTHO PermeaFix fixation. Leukemia 9:226–228.
3. Bikoue A, George F, Poncelet LW, et al 1996 Quantitative analysis of leukocyte membrane antigen expression: normal adult values. Cytometry 26:137–147.
4. Poncelet P, George F, Papa S, et al 1996 Quantitation of haemopoietic cell antigens in flow cytometry. European Journal of Histochemistry 40 (suppl 1):15–32.
5. Erber WN, Mynheer LC, Mason DY 1986 APAAP labelling of blood and bone-marrow samples for phenotyping leukaemia. Lancet i:761–765.
6. Mason DY, Erber WN 1991 Immunocytochemical labeling of leukemia samples with monoclonal antibodies by the APAAP procedure. In: Catovsky D (ed) The leukemic cell, p. 196. Churchill Livingstone, Edinburgh.
7. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al 1995 Proposals for the immunological classification of acute leukemias. Leukemia 9:1783–1786.
8. Bain BJ, Barnett D, Linch D, et al 2002. Revised guideline on immunophenotyping in acute leukaemias and chronic lymphoproliferative disorders. Clinical and Laboratory Haematology 24:1–13.
9. Janossy G, Coustan-Smith E, Campana D 1989 The reliability of cytoplasmic CD3 and CD22 antigen expression in the immunodiagnosis of acute leukemia: a study of 500 cases. Leukemia 3:170–181.
10. Buccheri V, Shetty V, Yoshida N, et al 1992 The role of an anti-myeloperoxidase antibody in the diagnosis and classification of acute leukaemia: a comparison with light and electron microscopy cytochemistry. British Journal of Haematology 80:62–68.
11. Buccheri V, Milhaljevic B, Matutes E, et al 1993 mb-1: a new marker for B-lineage lymphoblastic leukemia. Blood 82:853–857.
12. Tetteroo PAT, Lansdorp PM, Leeksma OC, et al 1983 Monoclonal antibodies against human platelet glycoprotein IIIa. British Journal of Haematology 55:509–522.

13. O'Connor SJ, Forsyth PD, Dalal S, et al 1997 The rapid diagnosis of acute promyelocytic leukaemia using PML (5E10) monoclonal antibody. British Journal of Haematology 99:597–604.
14. Falini B, Flenghi L, Lo Coco F, et al 1997 Immunocytochemical diagnosis of acute promyelocytic leukemia (M3) with the monoclonal antibody PG-M3 (anti-PML). Blood 90: 4046–4053.
15. Behm FG, Smith FO, Raimondi SC, et al 1996 Human homologue of the rat chondroitin sulfate proteoglycan, NG2, detected by monoclonal antibody 7.1 identifies childhood acute lymphoblastic leukemias with t(4;11)(q21;q23) or t(11;19)(q23;p13) and MLL rearrangements. Blood 87:1134–1139.
16. Wutchter C, Schnittger S, Schoch C, et al 1998 Detection of acute leukemia cells with 11q23 rearrangements by flow cytometry: sensitivity and specificity of monoclonal antibody 7.1. Blood 92 (suppl 1):228a.
17. Smith FO, Rauch C, Williams DE, et al 1996 The human homologue of rat NG2, a chondroitin sulfate proteoglycan is not expressed on the cell surface of normal hematopoietic cells but is expressed by acute myeloid leukemia blasts from poor prognosis patients with abnormalities of chromosome band 11q23. Blood 87:1123–1133.
18. Mauvieux L, Delabesse E, Bourquelot P, et al 1999 NG2 expression in MLL rearranged acute myeloid leukaemia is restricted to monoblastic cases. British Journal of Haematology 107:674–676.
19. Brunning RD, Borowitz M, Matutes E, et al 2001. Precursor B lymphoblastic leukaemia/lymphoblastic lymphoma. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H et al (eds) World Health Organization classification of tumours: tumours of haemopoietic and lymphoid tissues, pp. 111–114. IARC Press, Lyon.
20. Bene MC, Bernier M, Casasnovas RO, et al 1998 The reliability and specificity of c-kit for the diagnosis of acute myeloid leukemias and undifferentiated leukemias. Blood 92:596–599.
21. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al 1985 Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. Annals of Internal Medicine 103:620–625.
22. Matutes E, de Oliveria MP, Foroni L, et al 1988 The role of ultrastructural cytochemistry and monoclonal antibodies in clarifying the nature of undifferentiated cells in acute leukaemia. British Journal of Haematology 69:205–211.
23. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al 1991 Proposals for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). British Journal of Haematology 78:325–329.
24. Buccheri V, Matutes E, Dyer MJS, et al 1993 Lineage commitment in biphenotypic leukemia. Leukemia 7:919–927.
25. Matutes E, Morilla R, Farahat N, et al 1997 Definition of acute biphenotypic leukemia. Haematologica 82:64–66.
26. Brunning RD, Matutes E, Borowitz M, et al 2001 Acute leukaemias of ambiguous lineage. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H and Vardiman JW (eds) World Health Organization classification of tumours. Tumours of haemopoietic and lymphoid tissues, p. 27. IARC Press, Lyon.
27. Feulliard J, Jacob MC, Valensi F, et al 2002 Clinical and biological features of CD4+ CD56+ malignancies. Blood 99: 1556–1563.
28. Chan JKC, Wong KF, Jaffe ES, et al 2001 Aggressive NK cell leukaemia. In: ES Jaffe, NL Harris, H Stein and JW Vardiman (ed) World Health Organization classification of tumours: tumours of haemopoietic and lymphoid tissues, pp. 198–2000. IARC Press, Lyon.
29. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, et al 1994 The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. Leukemia 8:1640–1645.
30. Zomas AP, Matutes E, Morilla R, et al 1996 Expression of the immunoglobulin associated protein B29 in B-cell disorders with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). Leukemia 10:1966–1970.
31. Moureau EJ, Matutes E, A'Hern RP, et al 1997 Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). American Journal of Clinical Pathology 108:378–382.
32. Cabezudo E, Morilla R, Carrara P, et al 1999 Quantitative analysis of CD79b, CD5 and CD19 in B-cell lymphoproliferative disorders. Haematologica 84:413–418.
33. Delgado J, Matutes E, Morilla A, et al 2003 Diagnostic significance of CD20 and FMC7 expression in B cell disorders. American Journal of Clinical Pathology 120:754–759
34. Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, et al 1994 The immunophenotype of hairy cell leukemia (HCL): proposal for a scoring system to distinguish HCL from B-cell disorders with hairy or villous lymphocytes. Leukemia and Lymphoma 14 (suppl 1):57–61.
35. del Giudice I, Matutes E, Morilla R, et al 2004 The diagnostic value of CD123 in B-cell disorders with hairy or villous lymphocytes. Haematologica 89: 303-308
36. De Boer CJ, Schuuring E, Dreef E, et al 1995 Cyclin D1 protein analysis in the diagnosis of mantle-cell lymphoma. Blood 86:2715–2723.
37. Delmer A, Ajchenbaum-Cymbalista F, Tang R, et al 1995 Overexpression of cyclin D1 in chronic B-cell malignancies with abnormality of chromosome 11q13. British Journal of Haematology 89:798–804.
38. Elenaei MO, Jadayel DM, Matutes E, et al 2001 Cyclin D1 flow cytometry as a useful tool in the diagnosis of B-cell malignancies. Leukemia Research 25:115–123.
39. Thornton PD, Gruzka-Westwood AM, Hamoudi RA, et al 2004 Characterisation of TP53 abnormailities in chronic lymphocytic leukaemia. The Hematology Journal 5:47-54.
40. Lens D, Dyer MJS, Garcia Marco JA, et al 1997 p53 abnormalities in CLL are associated with excess of prolymphocytes and poor prognosis. British Journal of Haematology 99:848–857.
41. Dohner H, Fischer K, Bentz M, et al 1995 p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. Blood 85: 1580–1589.
42. Damle RN, Walie T, Fais F, et al 1999 Immunoglobulin V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. Blood 94:1840–1847.
43. Thornton PD, Fernandez C, Giustolisi G, et al 2004 CD38 as a prognostic indicator in chronic lymphocytic leukaemia. The Hematology Journal 5:145–151.
44. Crespo M, Bosch F, Villamor N, et al 2003 ZAP-70 expression as a surrogate for Immunoglobulin variable gene region mutations in chronic lymphocytic leukemia. New England Journal of Medicine 348:1764–1775.
45. Matutes E 2003 Chronic T-cell lymphoproliferative disorders. Reviews in Clinical and Experimental Haematology 6:401–420.
46. Matutes E, Brito-Babapulle V, Swansbury J, et al 1991 Clinical and laboratory features of 78 cases of T-prolymphocytic leukemia. Blood 78:3269–3274.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

47. Ginaldi L, Matutes E, Farahat N, et al 1996 Differential expression of CD3 and CD7 in T-cell malignancies: a quantitative study by flow cytometry. British Journal of Haematology 93:921–927.
48. Farahat N, Lens D, Zomas A, et al 1995 Quantitative flow cytometry can distinguish between normal and B-cell precursors. British Journal of Haematology 91:640–646.
49. Campana D, Counstan-Smith E 2002 Advances in the immunological monitoring of childhood acute lymphoblastic leukaemia. Best Practice Research on Clinical Haematology 15:1–19.
50. Cabezudo E, Matutes E, Ramrattan M, et al 1997 Analysis of residual disease in chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry. Leukemia 11:1909–1914.
51. Rawstron AC, Kennedy B, Evans PA, et al 2001 Quantitation of minimal residual disease levels in chronic lymphocytic leukemia improves the prediction of outcome and can be used to optimize therapy. Blood 98:29–35.
52. Matutes E, Meeus P, McLennan K, et al 1997 The significance of minimal residual disease in hairy cell leukaemia treated with deoxycoformycin: a long term follow-up study. British Journal of Haematology 98:375–383.

15 Radioisótopos en el diagnóstico hematológico

Inderjeet Dokal y S. Mitchell Lewis

Fuentes de radioisótopos 305
Protección radiológica 306
Medición de la radioactividad con un contador de centelleo 307
Mediciones con radioisótopo doble 308
Volumen hemático 309
Medición del volumen hemático 309
Masa eritrocitaria 309
Método del tecnecio 310
Volumen plasmático 310
Volumen sanguíneo total 311
Masa eritrocitaria esplénica 312
Ferrocinética 313
Distribución del hierro 313
Aclaramiento del hierro plasmático 313
Utilización del hierro 314
Distribución del hierro corporal 314
Estimación de la vida media de los hematíes *in vivo* 315
Método del cromo radioactivo (^{51}Cr) 315
Corrección de los datos de supervivencia por pérdida de sangre 318
Prueba de compatibilidad 319
Visualización del bazo mediante gammagrafía de centelleo 319
Función esplénica 319
Imágenes leucocitarias 320
Imágenes diversas 320
Medición de la pérdida sanguínea por el tracto gastrointestinal 320
Medición de la vida media de las plaquetas 321

Los isótopos radioactivos se deben distinguir de los isótopos no radioactivos del mismo compuesto químico. Las formas radioactivas se refieren por lo general a radionucleidos y radioisótopos. Estos términos son intercambiables, y en este capítulo se utilizará este último.

Los métodos que usan radioisótopos ocupan un importante lugar en el diagnóstico hematológico. Las pruebas que se pueden realizar en los servicios de hematología incluyen el volumen sanguíneo (VS), los estudios de supervivencia de los hematíes, las pruebas de absorción de la vitamina B_{12} (Schilling) y, en ocasiones, estudios ferrocinéticos. Para otro tipo de investigaciones, es preferible enviarlas a un servicio de física médica o de medicina nuclear.

Aunque las pruebas no se lleven a cabo directamente en el servicio de hematología, es esencial que los hematólogos conozcan sus principios y limitaciones, y sean capaces de interpretar los resultados en términos clínicos. Varios tratados (p. ej., Wagner y cols.[1], Maisey y cols.[2]) proporcionan informes más completos de la teoría y la práctica de las técnicas de medicina nuclear, como el monográfico de radioisótopos en hematología de Lewis y Bayly[3]. Las principales propiedades de los radioisótopos útiles en la hematología diagnóstica se resumen en la tabla 15.1. Las unidades utilizadas para expresar la radioactividad y los efectos de la radiación en el organismo se comentan en las páginas 593 y 594. Como se expone en este capítulo, cualquiera que maneje radioisótopos debe ser consciente del peligro de una radiación potencial. También es importante conocer el biorriesgo potencial del manejo de productos sanguíneos y de administrarlos a los pacientes (v. cap. 25).

FUENTES DE RADIOISÓTOPOS

Los radioisótopos que emiten rayos γ son particularmente útiles, pues tienen la ventaja de ser emisiones que penetran bien en los tejidos, por lo que se pueden detectar en la superficie del organismo cuando se han originado dentro de los órganos. Un radioisótopo debería tener una semivida ($T_{1/2}$) lo suficientemente corta como para ser compatible con la duración de la prueba. Un radioisótopo con una semivida muy corta se puede administrar a dosis mucho mayores que aquellos con probabilidad de permanecer activos en el organismo durante un tiempo considerablemente más largo.

Los radioisótopos de vida más larga que se usan en investigación hematológica suelen estar, por lo general, comercializados. La forma habitual de conseguir ciertos radioisótopos de vida corta es mediante un generador de radioisótopos, en el que un radioisótopo precursor de vida moderadamente larga se descompone para producir el ra-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 15.1. Radioisótopos utilizados para la investigación diagnóstica en hematología

Elemento	Vida media ($T_{1/2}$)	Energía (MeV)	Presentación farmacéutica	Aplicación	Actividad (MBq)	Dosis de radiación (mSv)	Equivalencia en placas de tórax[a]
^{57}Co	270 días	0,122 0,136	Vitamina B_{12}	Estudio de anemias megaloblásticas	0,02	0,05	3
^{58}Co	711,3 días	0,811 0,511			0,2	10	
^{51}Cr	27,8 días	0,320	Cromato sódico	Volumen de hematíes Vida media de hematíes Sangrado gastrointestinal Gammagrafía esplénica Reserva esplénica	0,8 2 4 4 4	0,3 0,6 1 1 1	15 30 50 50 50
^{59}Fe	45 días	1,09 1,29	Cloruro férrico o citrato	Absorción oral de hierro Estudios ferrocinéticos	0,4 0,4	4 4	200 200
^{125}I	60 días	0,035	Albúmina sérica humana yodada	Volumen plasmático	0,2	0,06[b]	3
^{111}In	2,81 días	0,247 0,173	Cloruro de indio→ oxina/tropolona	Volumen de hematíes Gammagrafía esplénica Vida media plaquetaria	2 5 4	1 2 2	50 100 100
^{99m}Tc	6 h	0,141	Pertecnetato	Volumen de hematíes Gammagrafía esplénica Reserva esplénica	2 100 100	0,02 1 1	1 50

MBq, megabecquerel; 1 MBq = 10^6 Bq = aproximadamente 27 μCi; Sv, sievert; 10^3 mSv = 1 Sv.
[a] El número de placas de tórax que expondría al sujeto a la misma cantidad de radiación que los isótopos de la lista. Una placa de tórax simple tiene una dosis de radiación de 0,02 mSv, aunque en ciertos estudios radiológicos es bastante superior. Por ejemplo, para una urografía intravenosa, una tomografía computarizada torácica (TC) o un estudio intestinal con bario, las dosis de radiación efectiva son 4,0; 8,0 y 9,0 mSv, respectivamente.
[b] Siempre que el tiroides esté bloqueado y el marcaje se excrete por la orina; si no está bloqueado, alrededor del 20% se acumulará en el tiroides, dando como resultado una dosis de radiación de 1 mSv en el tiroides

dioisótopo de vida corta requerido. Así, el ^{99m}Tc ($T_{1/2}$ = 6 h) se puede obtener por derivación del ^{99}Mo ($T_{1/2}$ = 66 h).

PROTECCIÓN RADIOLÓGICA

La cantidad de radioactividad que se emplea en el trabajo diagnóstico es, por lo general, pequeña, y para trabajar con seguridad basta observar una práctica correcta en el laboratorio. Sin embargo, antes de usar radioisótopos, los trabajadores deben familiarizarse con las normas relativas a la protección de sí mismos, de los demás trabajadores y de los pacientes[4].

El efecto de la radiación en el organismo depende de la cantidad de energía depositada y se expresa en grays (Gy). La unidad que describe el efecto global de la radiación en el organismo, o la «dosis equivalente», se mide en sieverts (Sv) o milisieverts (mSv). El límite anual para todo el organismo de cualquier trabajador con radioisótopos es del orden de 20 mSv, mientras que 1 mSv es el límite anual para el público general. Para ver esto en perspectiva, 1 mSv se produce por una radiación de fondo normal en 6 meses, y la dosis de radiación de una placa de tórax simple es de 0,02 mSv[5]. No se ha establecido ningún límite reglamentario de la dosis de radiación total anual para los pacientes, pero un requerimiento importante es que los radioisótopos se manipulen sólo en los laboratorios apropiados, bajo la dirección de una persona cualificada, que posea un certificado de la autoridad apropiada, especificando los radioisótopos que ese individuo está autorizado a utilizar y los límites de las dosis que no deberían excederse. En el Reino Unido, esta autoridad es el Administration of Radioactive Substances Advisory Committee (ARSAC)[5].

No se deben dar radioisótopos a mujeres embarazadas, a menos que el estudio se considere imperativo; si se necesita algún estudio durante la lactancia, la alimentación a pecho debe interrumpirse hasta que deje de detectarse radioactividad en la leche. Cuando se necesiten estudios con radioisótopos en niños, la dosis relativa a la del adulto se debe establecer basándose en la superficie corporal, más que en el peso corporal (tabla 15.2).

En general, los residuos radioactivos procedentes de radioisótopos utilizados en procedimientos de diagnóstico hematológico se pueden verter por un único fregadero designado del laboratorio. Se debe aclarar con una gran cantidad de agua corriente. Si el material de desecho excede la cantidad de eliminación permitida por esta vía, hay que almacenarlo en un lugar adecuado hasta que su radioactivi-

Tabla 15.2. Dosis de radioisótopos en niños como fracción de la dosis del adulto

Peso (kg)	Fracción de la dosis del adulto
10	0,3
15	0,4
20	0,5
30	0,6
40	0,75
50	0,9
60	0,95
70	1,0

dad haya decaído lo suficiente para ser eliminado por esta vía. Todas las áreas de trabajo y almacenamiento y los fregaderos de eliminación se deben etiquetar con el símbolo del trébol, que se emplea en todos los países del mundo.

La descontaminación de superficies de trabajo, paredes y suelos se puede lograr mediante el lavado con un detergente como el Decon 90 (Decon Laboratories, Ltd.). El material de cristal se puede descontaminar poniéndolo en remojo en Decon 90, y los utensilios de laboratorio de plástico se pueden descontaminar lavándolos en ácido nítrico diluido (p. ej., al 1%).

Se deben llevar siempre guantes protectores cuando se manejen radioisótopos; cualquier actividad que llegue a las manos se puede quitar lavando con jabón y agua o, si esto fracasa, con una solución de detergente. En cada laboratorio que use isótopos debe nombrarse un responsable de la protección radiológica que supervise los procedimientos de protección y que asegure que se mantiene un cuidadoso registro de todos los radioisótopos administrados. Este responsable tiene que trabajar en colaboración con el encargado de seguridad del departamento (v. pág. 553) y debe asegurarse de que todo el personal que trabaje con materiales radioactivos lleve dosímetros[a], los cuales se deben comprobar a intervalos regulares.

Aparatos para medir la radioactividad *in vitro*

Los radioisótopos usados en la mayoría de las pruebas hematológicas se miden con un contador de centelleo con cristales de yoduro sódico activado con talio. Están disponibles en varias formas y tamaños. Un cristal «tipo pocillo» contiene una cavidad en la que se inserta un pequeño contenedor o un tubo de ensayo que contenga 5 ml de fluido. Debido a que la muestra está casi completamente rodeada por el cristal, el recuento se realiza con una gran eficiencia. Y ya que la eficiencia geométrica de un contador de pocillos depende de la posición de la muestra en relación con el cristal, es importante usar el mismo volumen para cada muestra en la serie. Otra forma de detector de cristal es un cilindro sólido circular, de 2,5-10 cm de diámetro. Este tipo se usa para medidas *in vivo* y ocasionalmente para medidas de muestras voluminosas (p. ej., muestras de heces o de orina de 24 h), evitando así la necesidad de concentrarlas en un volumen menor.

Un método alternativo para medir el material voluminoso es usar dos detectores enfrentados en un sistema de contaje simple. La muestra se sitúa en una caja de cartón encerada de 450 ml con un tapón de rosca, y se coloca entre los dos contadores situados por encima y por debajo de ella, y con un anillo de goma sobre el contador inferior para asegurar que la muestra en la caja está más o menos equidistante de los dos cristales. El sistema de contaje se rodea con plomo, y las respuestas de los dos cristales se cuentan juntas. Si se usa un solo sistema de detección, es esencial homogeneizar las muestras.

Aparatos para medir la radioactividad *in vivo*

Contaje de superficie

El contaje de superficie depende del blindaje de los cristales por medio de un colimador de plomo, para evitar en la medida de lo posible emitir radiación de una zona fuera de un área bien definida del organismo. De esta forma, es posible medir la radioactividad en órganos individuales, tales como el bazo o el hígado.

Imagen

El método más ampliamente utilizado para la obtención de imágenes es la cámara de centelleo. Consiste en una cubierta de plomo, un detector de yoduro de sodio largo y delgado, una colección de tubos fotomultiplicadores, un colimador con múltiples agujeros paralelos, y un sistema para el análisis de la amplitud del pulso y para el almacenamiento y visualización de los datos. Cuando se escanea el cuerpo se obtiene una imagen de la distribución del marcador y se guarda. También se puede usar para medir la cantidad de isótopo en varios órganos. La tomografía por emisión de positrones (PET) ha superado a la gammagrafía por centelleo, y un refinamiento posterior es la tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT)[6,7].

Medición de la radioactividad con un contador de centelleo

Estandarización de las condiciones de trabajo

Para cada radioisótopo es necesario delimitar un espectro de distribución de la amplitud del pulso e identificar una ventana correspondiente a la energía a la que se emite el máximo número de pulsos. En la figura 15.1 se ilustran diversos ejemplos de espectros y de calibraciones seleccionados. El calibrado de los aparatos, una vez determinado, debe permanecer constante durante varios meses.

Técnica de contaje

Medición de la radioactividad

Las mediciones se llevan a cabo, por lo general, durante un período de tiempo determinado, y los resultados se guar-

[a] Disponible en ISO Pharma, Noruega; Mallinckrodt Medical (Nuclear Medicine Division), Northampton.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

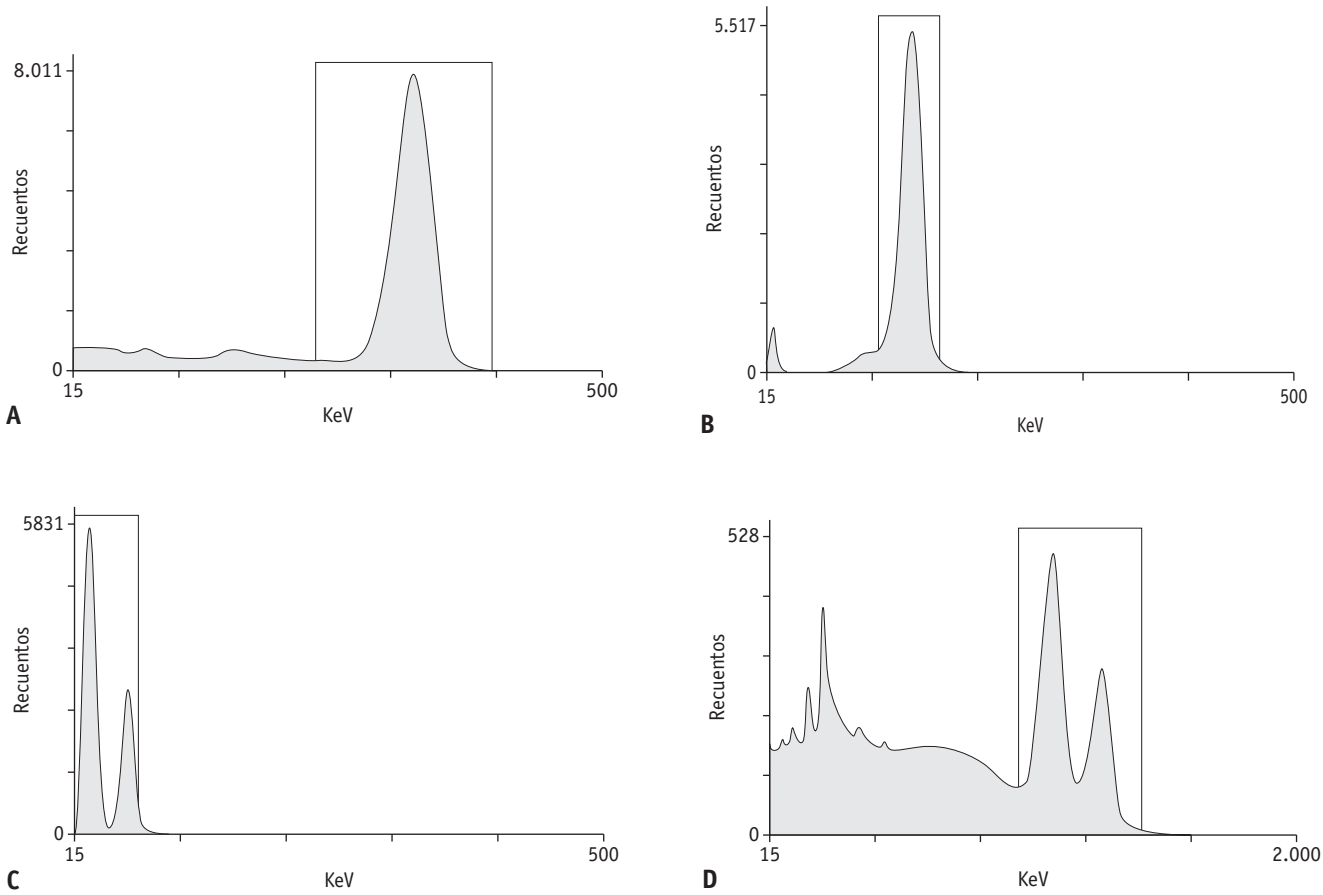


Figura 15.1. Espectros de radioisótopos obtenidos con un espectrómetro de centelleo. A: ^{51}Cr; B: ^{99m}Tc; C: ^{125}I, y D: ^{59}Fe. Los radionucleidos deben contarse en la ventana establecida dentro de los límites indicados por las líneas verticales.

dan como cuentas por segundo (cps) o como cuentas por minuto (cpm). La radioactividad está sujeta a una variación al azar, aunque estadísticamente predecible, similar a la del recuento de células sanguíneas (v. pág. 683). La exactitud del contaje depende del número total de cuentas registrado como la varianza (σ) de la cuenta de radioactividad = √ cuenta total.

Así, en un recuento de 100, el error inherente es el 10%; en un recuento de 10.000 es un 1%. Cualquier actividad medida representa la diferencia entre el recuento de la muestra y el recuento de fondo, en la que los errores de ambos recuentos son acumulativos. En la práctica, un recuento neto de 2.500 sobre el fondo es adecuado para la precisión que se requiere en los estudios clínicos.

Los recuentos de fondo se deben medir junto con el del material radioactivo. Si la tasa de recuento de la muestra no es muy superior a la del fondo, entonces se mide el fondo al mismo tiempo que la muestra. Si la tasa de recuento de la muestra es menor que la del fondo, se necesitan tiempos de contaje extremadamente largos para obtener una medida precisa.

Corrección de la desintegración física

Ya que la desintegración física es un proceso continuo que avanza de manera exponencial, es posible corregir matemáticamente la pérdida de radioactividad, y convertir cualquier medida nuevamente en la del tiempo inicial de referencia. Esto resulta necesario cuando se comparan observaciones sucesivas hechas en diferentes tiempos tras la administración de un radionucleido a un paciente.

Mediciones con radioisótopo doble

Si en una muestra hay más de un radionucleido, es posible medir la radioactividad de cada radioisótopo por separado mediante las siguientes técnicas.

Desintegración diferencial

La desintegración diferencial es especialmente útil cuando uno de los marcadores tiene una semivida muy corta (p. ej., ^{99m}Tc, semivida de 6 h). El método consiste en contar la actividad de la mezcla dos veces: el segundo recuento cuando el marcador de vida corta haya desaparecido completamente.

Separación física

Cuando los dos radioisótopos producen rayos γ de diferentes energías, se pueden identificar por sus rasgos característicos y es posible separarlos utilizando un analizador de energía. Las correcciones de cualquier «fuga» se llevan a

cabo contando el estándar de cada radionucleido (A y B) con la misma calibración del canal. La proporción de A (P_A) que se desborda al canal B = recuento del canal B ÷ el recuento del canal A del radionucleido A estándar (ambos con el fondo corregido), y la proporción de B (P_B) que se desborda al canal A = recuento del canal A ÷ el recuento del canal B del radionucleido B estándar. El recuento total obtenido de los A y B marcados en sus canales correctos se puede corregir entonces con la proporción de recuentos «extraños».

VOLUMEN HEMÁTICO

El contenido de hemoglobina, el número total de hematíes y el hematocrito (Hto) no reflejan en todos los casos el volumen total de hematíes (VE). Aunque, por razones prácticas, en la mayoría de los casos hay una adecuada correlación entre los valores de sangre periférica y el VE (total)[8], habrá diferencias si el volumen plasmático está desproporcionadamente reducido o aumentado. Las fluctuaciones en el volumen plasmático pueden llevar a una hemodilución o, por el contrario, a una hemoconcentración, dando lugar a una seudoanemia o a una seudopolicitemia, respectivamente.

Durante el embarazo tiene lugar un aumento del volumen plasmático, que vuelve a la normalidad rápidamente tras el parto. También se pueden encontrar volúmenes plasmáticos elevados en pacientes con cirrosis, nefritis e insuficiencia cardíaca congestiva y cuando hay una esplenomegalia marcada. Volúmenes de plasma reducidos aparecen en situaciones de estrés, edema, deshidratación, tras la administración de fármacos diuréticos y en fumadores. También ocurre durante el descanso en cama prolongado.

En contraste con las fluctuaciones en el volumen plasmático, el VE no fluctúa en ningún sentido si la eritropoyesis se encuentra en estado de equilibrio.

El volumen sanguíneo se debe medir, por tanto, cuando el Hto esté persistentemente más alto de lo normal; es necesaria la demostración de un aumento absoluto del VE para diagnosticar una policitemia y para valorar su gravedad. Las partes que componen el VS (es decir, hematíes y volumen plasmático) se deben medir también por separado para aclarar el origen de ciertas anemias, cuando no se pueda excluir la posibilidad de un volumen plasmático aumentado.

Medición del volumen hemático

Principio

El principio es el del análisis de la dilución. Se inyecta por vía intravenosa un pequeño volumen de radioisótopo fácilmente identificable, que se una tanto a hematíes como a los componentes del plasma, y se mide su dilución tras dejar pasar el tiempo necesario para que el material inyectado se mezcle perfectamente en la circulación, pero antes de que cantidades significativas dejen la circulación o se desliguen. El método más práctico disponible actualmente consiste en usar un pequeño volumen de hematíes del paciente marcados con cromo radioactivo (^{51}Cr), tecnecio (pertecnetato) (^{99m}Tc) o indio (^{111}In). Los hematíes marcados se diluyen en toda la sangre del paciente, y de su dilución se puede calcular el VS total; el VE también se puede deducir conociendo el Hto. El volumen de plasma se puede medir directamente inyectando albúmina humana marcada con yodo radioactivo (^{125}I), que se diluye en el compartimento plasmático.

A diferencia de la medida del VE, las medidas del volumen plasmático son sólo aproximaciones, porque la albúmina marcada experimenta un lento intercambio continuo entre el plasma y el líquido extravascular, incluso durante el período de mezcla. Por esta razón, no es aconsejable intentar calcular el VE desde el volumen plasmático basándose en el Hto observado. Sin embargo, ya que el VE es por lo general más estable, el cálculo del VS a partir del VE es normalmente más fiable, siempre que la diferencia entre el Hto total del organismo y el venoso sea apreciable y permita hacerlo (v. pág. 311). Es preferible realizar las medidas de células y volúmenes plasmáticos por métodos directos por separado.

Masa eritrocitaria

Método del cromo radioactivo

Para el método del cromo radioactivo[9], añadir aproximadamente 10 ml de sangre a 1,5 ml de solución NIH-A ácido cítrico-citrato sódico-dextrosa (ACD) estéril (v. pág. 683) en un frasco estéril con un tapón de rosca. Centrifugar a 1.200-1.500 g durante 5 min. Descartar el sobrenadante y la capa leucocitaria y lentamente, mezclándolo de manera continua, añadir a las células 8×10^3 Bq de $Na_2{}^{51}CrO_4$ por kg de peso corporal. El cromato sódico debe estar en un volumen de al menos 0,2 ml, diluyéndolo en NaCl (solución salina) 9 g/l. Dejar reposar la sangre durante 15 min a 37 °C para que se produzca el marcaje. Lavar los hematíes dos veces en 4-5 volúmenes de solución salina estéril[b].

Por último, volver a suspender las células en un volumen de solución salina estéril suficiente para una inyección de aproximadamente 5 ml y la preparación de un estándar. Tomar el volumen apropiado en una jeringuilla que se pesará antes y después de la inyección. El volumen inyectado se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen inyectado (ml)} = \frac{\text{Peso de la suspensión inyectada (g)}}{\text{Densidad de la suspensión (g/ml)}}$$

La densidad de la suspensión = 1,0 + concentración de la Hb de la suspensión (g/l) × 0,097/340, asumiendo que el hematocrito tiene una concentración de hemoglobina

[b] Para todos los procesos que requieran suero salino, éste debe ser cloruro sódico BP (apirogénico) 9 g/l (0,9%); se debe emplear el NaCl 12 g/l cuando la fragilidad osmótica de los hematíes se encuentre claramente aumentada (p. ej., en casos de esferocitosis hereditaria).

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

corpuscular media (CHCM) de 340 g/l y una densidad de 1,097. Inyectar la suspensión intravenosa sin demora y anotar el tiempo; 10, 20 y 30 min más tarde, extraer 5-10 ml de la sangre del paciente y añadirle la cantidad apropiada del anticoagulante K_2-EDTA. Se aconseja obtener esta sangre de una vena diferente a la utilizada para la inyección. Sin embargo, muchas veces suele ser conveniente insertar una aguja de autorretención (tipo mariposa); en este caso, hay que asegurarse de que al inyectarlo el isótopo se disperse bien en el torrente sanguíneo mediante un lavado con una embolada de 10 ml de solución salina estéril. Cuando se prevea que el tiempo de mezclado va a ser largo, como en caso de esplenomegalia, insuficiencia cardíaca o shock, se debe obtener otra muestra a los 60 min tras la inyección.

Proceder a la medición del Hto de cada muestra[c]. Depositar volúmenes de 1 ml en los tubos de contaje y lisarlos con saponina; un método adecuado es añadir 2 gotas de saponina al 2%. Medir su radioactividad en un contador de centelleo. Diluir entonces una parte alícuota de la suspensión original que no fue inyectada al 1:500 en agua (para usarlo como estándar) y determinar la radioactividad de un volumen de 1 ml. Entonces:

$$\text{Volumen de hematíes (VE) (ml)} = \frac{\text{Radioactividad del estándar (cpm/ml)} \times \text{Dilución del estándar} \times \text{Volumen inyectado (ml)}}{\text{Radioactividad de la muestra sanguínea postinyección (cpm/ml)}} \times \text{Hto (de la muestra)}$$

Volumen sanguíneo total

El volumen sanguíneo total (VST) se puede calcular multiplicando el valor del VE por 1/(Hto total del organismo) (v. pág. 28). El volumen plasmático se puede calcular restando el VE al VST.

Si se ha obtenido una muestra a los 60 min, en los casos en los que se sospechaba un retraso en la mezcla, si hay diferencias significativas entre las medidas a los 10-30 min y a los 60 min, para calcular el VE se debe usar la medida de los 60 min.

Método del tecnecio

El ^{99m}Tc se suministra como pertecnetato sódico. Pasa con total libertad a través de la membrana de los hematíes, y se unirá a las células sólo si al entrar en ellas se encuentra en forma reducida; si es así se une firmemente a las cadenas β de la hemoglobina. Para que esto ocurra, la célula se debe tratar con un compuesto de estaño mediante el siguiente procedimiento *in vivo*.

Disolver un vial de reactivo de estaño[d] en 6 ml de suero salino e inyectar 0,03 ml/kg de peso corporal por vía intravenosa.

Tras 15 min, extraer 5 ml de sangre en un recipiente estéril al que se le hayan añadido 200 UI de heparina líquida. Añadir 2 MBq de ^{99m}Tc recién generado en aproximadamente 0,2 ml de solución salina o 100 MBq si se necesita también medir de la reserva de hematíes esplénicos y hacer una gammagrafía. Dejarlo reposar a temperatura ambiente durante 5 min. Centrifugar; lavar dos veces en solución salina estéril fría, y volver a suspender en un volumen suficiente de solución salina estéril frío como para una inyección de 5-10 ml. Extraer 5 ml en una jeringa que se haya pesado antes y después de la inyección y llevar a cabo procedimientos posteriores, como en el método del cromo. Debido a la corta semivida del ^{99m}Tc, se debe medir la radioactividad el mismo día de la prueba. Ya que el 5-10 % de la radioactividad se eluye de los hematíes en una hora, el método es menos apropiado que los métodos del cromo y del indio cuando se sospeche un retraso en la mezcla (p. ej., en la esplenomegalia).

El indio se suministra como cloruro de ^{111}In. El proceso de marcaje es más sencillo que el del ^{99m}Tc, y debido a que hay menos pérdida que con el tecnecio durante la primera hora[10], es especialmente apropiado para las muestras con retraso. Para el marcaje de las células sanguíneas, el indio forma complejos con oxina[11] o tropolona[12].

Volumen plasmático

Método de la albúmina sérica humana-^{125}I

En el mercado[e] se comercializa albúmina sérica humana (ASH) marcada con ^{125}I o ^{131}I. La concentración de albúmina no debería ser menor de 20 g/l. Hay que asegurarse de que las únicas fuentes de albúmina han sido donantes negativos para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y las hepatitis B y C. El ^{125}I es fácilmente distinguible del ^{51}Cr, ^{99m}Tc e ^{111}In, y esto hace posible la detección directa simultánea de VE y del volumen plasmático (v. más adelante). Si se administran nuevas dosis de radioisótopos para repetir la prueba, es aconsejable bloquear el tiroides administrando 30 mg de yoduro potásico por vía oral el día antes de la prueba, y diariamente durante las 2-3 semanas posteriores.

Extraer aproximadamente 20 ml de sangre con una jeringuilla que contenga unas gotas de solución de heparina estéril, y transferirla a un frasco estéril de 30 ml con un tapón de rosca. Tras centrifugar a 1.200-1.500 g durante 5-10 min, transferir aproximadamente 7 ml de plasma a un segundo frasco estéril y añadir $2,5 \times 10^3$ Bq de la ASH marcada con radionucleido por kilogramo de peso corporal

[c] El Hto se debe obtener por centrifugación microhematocrítica durante 5 min, o durante 10 min si el Hto es superior a 0,50, y corregir el plasma atrapado descontando un 2% a las medidas. Se puede obtener una medición más precisa del Hto mediante el método de diferencia adaptado del International Council for Standardization in Haematology (ICSH) (v. pág. 29).

[d] Fluoruro de estaño y medronato de sodio (Amerscan, Amersham International).

[e] Disponible en ISO Pharma, Noruega; Mallinckrodt Medical (Nuclear Medicine Division), Northampton.

(aproximadamente 0,2 MBq en total). Inyectar una cantidad conocida (p. ej., 5 ml) y conservar el resto para la preparación de un estándar.

Tras 10, 20 y 30 min, extraer muestras sanguíneas de una vena diferente a la usada para la inyección original (o tras la perfusión de una embolada de 10 ml de NaCl (solución salina) estéril, 9 g/l, si se ha utilizado una aguja tipo mariposa) y repartirlo en frascos que contengan EDTA o heparina.

Medir el Hto (v. nota al pie de pagina *c*, pág. 310), centrifugar la muestra y separar el plasma. Preparar el estándar diluyendo parte del ASH que no se inyectó a 1:100 en solución salina.

Medir la radioactividad de las muestras de plasma con un contador de centelleo y, mediante la extrapolación en un papel semilogarítmico, calcular la radioactividad del plasma en el tiempo cero. Si se recoge una única muestra a los 10 min de la inyección, podemos aproximarnos a la radioactividad en el tiempo cero multiplicando por 1,015, para tener en cuenta la pérdida temprana de radioisótopos de la circulación. Confiar en una única muestra a los 10 min nos puede llevar a error si la mezcla de la albúmina en el plasma se retrasa. Tras medir la radioactividad del estándar, el volumen plasmático (ml) se calcula de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Radioactividad del estándar (cpm/ml)} \times \text{Dilución del estándar} \times \text{Volumen inyectado (ml)}}{\text{Radioactividad de la muestra postinyección (cpm/ml, ajustada al tiempo cero)}}$$

Volumen sanguíneo total

Como ya se ha indicado, el VST se calcula normalmente a partir del VE y del Hto. Antes de poder hacer esto, sin embargo, hay que corregir el Hto observado por la diferencia entre el Hto venoso y el total del organismo.

Ratio entre el hematocrito venoso y el total del organismo

El Hto medido en sangre venosa no se corresponde exactamente con el Hto promedio de toda la sangre del organismo. Esto se debe principalmente a que la ratio hematíes:plasma es menor en los vasos sanguíneos pequeños (capilares, arteriolas y vénulas) que en los grandes vasos. La ratio entre el Hto de todo el organismo y el Hto de la sangre venosa[9] es normalmente de 0,9 y, por tanto, para calcular el VST a partir de las mediciones del VE es necesario multiplicar el Hto observado por 0,9. Así, el VST viene dado por lo siguiente:

$$\text{Volumen de hematíes} \times \frac{1}{\text{Hto} \times 0{,}9}$$

Sin embargo, la ratio varía según la situación, especialmente en la esplenomegalia, y es mejor estimar el VE y el volumen plasmático en mediciones separadas que intentar calcular primero uno de ellos y después estimar el otro.

Medición simultánea del volumen eritrocitario y del volumen plasmático

Extraer sangre y marcar los hematíes mediante uno de los métodos descritos previamente. Si se usa el ^{99m}Tc, es necesario inyectar primero un reactivo de estaño. Añadir entonces ASH ^{125}I (v. más arriba) y mezclarlo con la suspensión de hematíes marcados. Inyectar una medida exacta y diluir lo que queda a 1:500 en agua para usar como estándar. Extraer tres muestras sanguíneas a 10, 20 y 30 min, respectivamente, tras la administración de la sangre marcada, y estimar la radioactividad de un volumen determinado para cada muestra y un volumen similar del estándar.

Cuando se use el ^{99m}Tc en combinación con el ^{125}I, hay que hacer el contaje el mismo día; dejarlo después durante dos días para que disminuya el ^{99m}Tc y contar otra vez la actividad del ^{125}I. Debido a que la radioactividad en la preparación del ^{125}I es mucho más pequeña que la del ^{99m}Tc, no es probable que el recuento de hematíes se vea significativamente alterado por la interferencia del ^{125}I en la cuenta inicial. No obstante, si fuera necesario, se podría realizar una corrección, restando el recuento del ^{125}I del día 2 (corregido para tener en cuenta la desintegración) del recuento original para obtener la medida del recuento que corresponda sólo al ^{99m}Tc.

Cuando se usa el ^{51}Cr en combinación con el ^{125}I, y se dispone de un contador multicanal, hay que medir la radioactividad correspondiente al ^{51}Cr y al ^{125}I con un calibrado apropiado para el ^{51}Cr y el ^{125}I.

Calcular la radioactividad correspondiente a los hematíes marcados en la sangre, a partir del valor promedio de las muestras a los 10, 20 y 30 min, y obtener aquella que pertenezca al ^{125}I del valor extrapolado a tiempo cero. Calcular el VE como se describe en la página 310.

El volumen plasmático se calcula según la fórmula:

$$\frac{\text{Radioactividad del estándar (cpm/ml)} \times \text{Dilución del estándar} \times \text{volumen inyectado (ml)} \times (1-\text{Hto})}{\text{Radioactividad de la muestra postinyección (cpm/ml, corregida al tiempo cero)}}$$

Volumen sanguíneo total = VE + volumen plasmático

Expresión de los resultados de la estimación del volumen sanguíneo

El VE, el volumen plasmático y el VST se expresan normalmente en ml/kg de peso corporal. Debido a que la grasa es relativamente avascular, se obtienen valores bajos en los sujetos obesos, y la relación entre el VS y el peso corporal varía según la composición del organismo. El volumen sanguíneo se relaciona más estrechamente con la masa corporal magra (MCM)[13]. Algunos de los primeros métodos para determinar la MCM no eran prácticos como procedimiento rutinario, y el descuento del exceso de grasa utilizando un estimador del denominado «peso ideal» es arbitrario y tiende a sobrecorregir la avascularidad de la grasa. El International Council for Standardization in Haematology (ICSH) desarrolló dos fórmulas, basadas en la superficie corporal, que proporcionan valores de referencia

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

normales en hombres y mujeres, respectivamente[14]. Son las que exponemos en los apartados siguientes.

Masa eritrocitaria media normal (ml)

Hombres: [1.486 × S] – 825; ± 25% incluye límites del 98%.

Mujeres: [1,06 × edad (años)] + [822 × S]; ±25% incluye límites del 99%.

Volumen plasmático medio normal (ml)

Hombres: 1.578 × S; ±25% incluye los límites del 99%.

Mujeres: 1.395 × S; ±25% incluye los límites del 99%.

$$S = [W^{0,425} \times H^{0,725} \times 0,007184],$$

donde S = área de superficie (m^2), W = peso (kg), H = altura (cm).

Sin embargo, el problema de establecer la MCM se ha superado en cierta medida, ya que ahora disponemos de instrumentos de fácil utilización para estimar la composición corporal, que se basan en la diferente respuesta de la grasa y de otros tejidos a la impedancia eléctrica[f,13,15].

Por tanto, el VE se puede obtener actualmente mediante una medición directa que ya descuenta el efecto de la grasa. El gráfico de la figura 15.2 muestra la normalización del VE en ml/kg de MCM[13]. Se obtiene de la siguiente manera; en un papel aritmético con el % de grasa en el eje horizontal (x) y el VE en ml/kg del peso corporal total en el eje vertical (y), se traza la intersección de lo siguiente:

20% de grasa con 29 ml de VE; 50% de grasa con 19 ml de VE.

Unir esos dos puntos, y prolongar la línea a la izquierda y a la derecha.

Cuando se conozca el % de grasa de un individuo (sea hombre o mujer), dibujar una línea vertical desde este punto del eje x hasta la pendiente y, desde donde esta línea corte a la pendiente, dibujar una línea horizontal hasta el eje y. El punto de corte de esta línea en el eje y es el VE normalizado para ese individuo. Cuando la medida del VE sea >120% de esta cifra, será equivalente a 43 ml/kg de MCM, y podremos hacer entonces con seguridad un diagnóstico de policitemia tanto en hombres como en mujeres.

Límites en individuos sanos

El VST es de 250-350 ml al nacer. Tras la infancia, el volumen va aumentando gradualmente hasta la vida adulta, momento en el que el VE en hombres es de 30 ± 5 ml (2DE)/kg, y en mujeres es de 25 ± 5 ml (2DE)/kg. El volumen plasmático (para hombres y mujeres) es de 40-50 ml/kg; y el VST es de 60-80 ml/kg.

Por norma, el VS se mantiene extraordinariamente constante en un individuo, y tras una transfusión sanguínea o una perfusión intravenosa tienen lugar rápidos ajustes en unas pocas horas. Durante el embarazo, tanto el volumen plasmático como el VST aumentan. El volumen plasmático aumenta especialmente en el primer trimestre, y el volumen total aumenta después; cuando el embarazo esté a término el volumen plasmático se habrá incrementado alrededor de un 40% y el VST habrá aumentado un 32% o incluso más. El VS vuelve a la normalidad dentro de la primera semana tras el parto[16].

El reposo en cama origina una reducción del plasma sanguíneo, y el ejercicio muscular y los cambios en la postura originan fluctuaciones transitorias. En la práctica, al paciente se le debería dejar descansar en decúbito durante 15 min antes de medir su volumen sanguíneo.

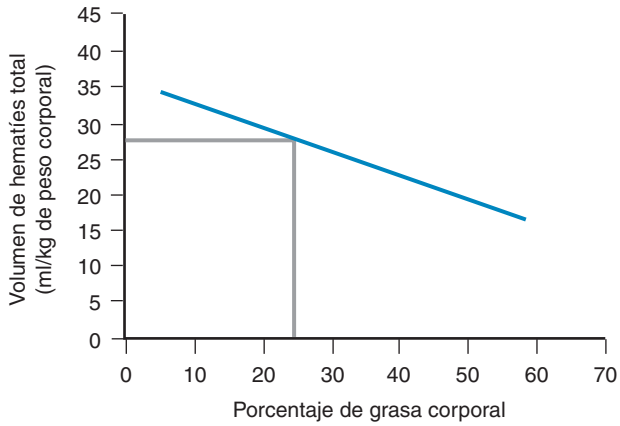


Figura 15.2. Normalización del volumen de hematíes en ml/kg de masa corporal magra (v. texto). El ejemplo muestra un paciente con un 25% de grasa corporal; según la pendiente del gráfico, el volumen normalizado de hematíes para esa persona debería ser de 28 ml/kg de peso corporal. Una medida superior al 120% de este valor (es decir, 33,6 ml) indicaría una policitemia.

Masa eritrocitaria esplénica

El contenido en hematíes de un bazo normal (la reserva de hematíes) es menor del 5% del VE total (es decir, <100-120 ml en un adulto). En la esplenomegalia, esta reserva aumenta (p. ej., unas 5-10 veces en la mielofibrosis, la policitemia, la leucemia de células peludas y los trastornos linfoproliferativos)[17]. Un aumento en el volumen de la reserva de hematíes esplénicos puede ser por sí mismo una causa de anemia; la medida de la reserva puede ser útil en el estudio de la anemia en estos trastornos. También es útil para determinar la causa de hematíesis, porque esta reserva, que está aumentada en la policitemia vera, contrasta con la de la poliglobulia secundaria, en la que es normal[18].

Se puede obtener una estimación aproximada del VE esplénico gracias a la diferencia entre el VE calculado a partir de la medición de la muestra de sangre que haya sido recogida 2-3 min tras la inyección de células marcadas, y la medición después de que la mezcla se haya completado (es decir, tras una espera de 20 min). El VE esplénico se puede estimar más exactamente con una gammagrafía cuantitativa, tras la inyección de hematíes viables marcados con ^{99m}Tc[19]. El volumen sanguíneo se mide de manera habitual utilizando 100 MBq de ^{99m}Tc. El área esplénica se

[f] Body composition analyser, Holtain Ltd, Crosswell, Dyfed, Gales; Body fat monitor, Tanita Corporation.

escanea a los 20 min tras la inyección o a los 60 min si existe esplenomegalia. Para delimitar el bazo de manera más precisa, puede ser necesario llevar a cabo una segunda gammagrafía tras una inyección de hematíes marcados dañados por calor (v. pág. 319). Con la radioactividad del bazo, relativa a la del estándar, y el conocimiento del VE total, se puede calcular la proporción del VE total contenido en el bazo. Esta técnica también se usa para demostrar la acumulación localizada de sangre en los hemangiomas del hígado[20], en las telangiectasias y en otras alteraciones vasculares[21].

FERROCINÉTICA

Al igual que se puede aprender mucho acerca de la tasa y la eficiencia de la eritropoyesis con el recuento de hematíes y reticulocitos, los estudios del metabolismo del hierro y la estimación de la vida media de los hematíes con isótopos radioactivos nos pueden proporcionar una información adicional muy valiosa.

El hierro radioactivo (^{59}Fe)[g] tiene una semivida moderadamente corta, unos 45 días, y marca la hemoglobina tras la inyección. También marca la reserva de hierro plasmático, y esto permite la estimación del aclaramiento de hierro y el cálculo de la renovación del hierro plasmático. Su posterior aparición en la hemoglobina permite valorar la tasa de síntesis de hemoglobina y la completa utilización del hierro. Dado que es un emisor de rayos γ, se puede medir la radioactividad *in vivo*, y se pueden determinar los lugares de distribución del hierro administrado y los probables lugares de eritropoyesis.

Distribución del hierro

Principio

El hierro se transporta a la médula ósea unido a la transferrina. En la superficie de los eritroblastos, el complejo libera su hierro, el cual entra en la célula para incorporarse al hemo, liberando a la transferrina para que se recicle. El hierro no unido a la transferrina llega al hígado y a otros órganos, en vez de a la médula ósea, mientras que las partículas coloidales de hierro son rápidamente eliminadas por las células fagocitarias.

Los estudios ferrocinéticos con ^{59}Fe que proporcionan información de la eritropoyesis incluyen la tasa de aclaramiento del radiohierro del plasma y la incorporación del hierro a los hematíes circulantes (utilización del hierro). Éstos son procedimientos relativamente simples, pero no tienen en cuenta la recirculación del hierro que vuelve al plasma desde los tejidos, ni la renovación férrica resultante de la diseritropoyesis o de la hemólisis. Para tener en cuenta estos factores se requieren procedimientos mucho más largos y complejos, con múltiples muestras durante un largo período de tiempo[22], pero las pruebas más sencillas proporcionan mediciones suficientemente fiables y útiles para los propósitos clínicos.

En los estudios ferrocinéticos es importante asegurarse de que el hierro administrado se una a la transferrina. En la mayoría de los casos, el plasma contiene una cantidad adecuada de transferrina. Sin embargo, antes de llevar a cabo la prueba, debería medirse la capacidad no saturada de fijación del hierro (UIBC, del inglés *unsaturated iron-binding capacity*) o la concentración de transferrina del plasma del paciente, y si el UIBC es <1 mg/l (20 µmol/l) o la concentración de transferrina es <0,6 g/l, hay que utilizar plasma de donante normal (negativo para VIH y hepatitis B y C) en lugar del plasma del paciente para el posterior proceso de marcado.

Método

En condiciones estériles, obtener 5-10 ml de plasma de sangre fresca heparinizada. Añadir 0,4 MBq de citrato férrico ^{59}Fe (actividad específica >0,2MBq/µg). Incubar a temperatura ambiente durante 15 min. Llenar una jeringuilla con alrededor de 1 ml de la mezcla. Pesar la jeringa hasta aproximadamente 10 mg. Inyectar su contenido por vía intravenosa en el paciente, poniendo en marcha el cronómetro en el punto medio de la inyección. Volver a pesar la jeringuilla vacía y calcular el volumen inyectado.

$$\text{Volumen de plasma (ml)} = \frac{\text{Peso del plasma (g)}}{1{,}015}$$

Diluir la porción residual de la dosis (1 ml) al 1:100 en agua y usarla como medida de la cantidad total de radioactividad y como un estándar en las siguientes mediciones.

Aclaramiento del hierro plasmático

Extraer una muestra a los 3 min, y 4 o 5 muestras más a lo largo de un período de 1-2 h, manteniéndolas con heparina o EDTA. Conservar una parte de una de las muestras para medir el hierro plasmático. Medir la radioactividad en volúmenes unitarios de plasma de las muestras y trazar los valores obtenidos en un papel logarítmico lineal. Se obtendrá por lo general una línea recta para la pendiente inicial. La radioactividad en el momento de la inyección se infiere mediante la extrapolación en el tiempo cero, y ya se puede deducir de la gráfica el tiempo empleado para disminuir a la mitad el valor inicial de la radioactividad plasmática (aclaramiento del plasma-$T_{1/2}$) (fig. 15.3).

Límites del aclaramiento del plasma-$T_{1/2}$ en individuos sanos

Los límites en individuos sanos son de 60-140 min.

La tasa de aclaramiento se ve influenciada por la intensidad de la eritropoyesis y por la actividad de los macrófagos del sistema reticuloendotelial (RE), especialmente en el hígado, el bazo y la médula ósea, donde se retiene hierro como hierro de almacenamiento. También, aunque en menor medida, los reticulocitos circulantes pueden captar parte del hierro. Un aclaramiento rápido indica una hiperacti-

[g] El ^{59}Fe no está disponible por el momento por su suministrador oficial, Amersham plc, pero puede estar disponible en POLATOM, www.polatom.pl.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

vidad de uno o más de estos mecanismos, como por ejemplo en las anemias ferropénicas, las anemias hemorrágicas, las anemias hemolíticas y la policitemia vera. La tasa de aclaramiento está disminuida en la anemia aplásica. En la leucemia y en la mielofibrosis, los resultados son variables, dependiendo de la cantidad de médula hematopoyética y de la extensión de la eritropoyesis extramedular; en la mielofibrosis, sin embargo, un aclaramiento rápido es, con diferencia, el hallazgo más frecuente. En las diseritropoyesis, el aclaramiento puede ser normal o estar acelerado.

Utilización del hierro

Extraer muestras de sangre a diario, o al menos en días alternativos, durante un período de aproximadamente 2 semanas tras la administración de ^{59}Fe. Medir la radioactividad por mililitro de toda la sangre y calcular el porcentaje de utilización de cada día según la fórmula:

$$\frac{\text{cpm/ml de muestra de sangre completa diaria} \times 100 \times f}{\text{cpm/ml de la muestra de sangre completa en el tiempo cero}}$$

donde *f* es un factor de corrección del Hto.

$$\text{Es decir, } \frac{0{,}9\ \text{Hto}}{1 - 0{,}9\ \text{Hto}}$$

Cuando haya razones para sospechar que la ratio de Hto corporal:venoso no es de 0,9, hay que medir el VE por un método directo (v. pág. 310). Hay que tener en cuenta, sin embargo, que ya que el cálculo del volumen plasmático por extrapolación de la curva de desaparición del ^{59}Fe no es muy fiable, no se debería usar como base para el cálculo del VE. Calcular el porcentaje de utilización de cada día con la fórmula:

$$\text{Porcentaje de utilización} = \frac{\text{Volumen eritrocitario (ml)} \times \text{cpm/ml eritrocitario} \times 100}{\text{Radioactividad total inyectada (cpm)}^{h}}$$

Trazar los porcentajes medidos diariamente frente al tiempo en un papel milimetrado aritmético. Registrar la utilización máxima (fig. 15.4).

El cálculo da una medida de la eritropoyesis efectiva. En sujetos normales, la radioactividad de los hematíes aumenta de manera constante desde las 24 h y alcanza un máximo de utilización del 70-80% entre los días 10 a 14.

Un aclaramiento plasmático rápido suele asociarse con una utilización temprana y relativamente completa, y viceversa. Los resultados son variable en las anemias megaloblásticas y en las hemoglobinopatías en las que hay una eritropoyesis ineficaz; también son variables en la mielofibrosis, según la extensión de la eritropoyesis extramedular y si la vida media de los hematíes está disminuida. Si hay una rápida hemólisis, la curva de utilización se verá distorsionada por la destrucción de algunos de los hematíes marcados; esto se puede apreciar si se miden las muestras frecuentemente (a diario). En la anemia aplásica, la utilización es de aproximadamente el 10-15%; en la eritropoyesis ineficaz, es por norma de un 30-50%.

Los patrones ferrocinéticos de diversas enfermedades se muestran en la tabla 15.3 y en la figura 15.4.

[h] La radioactividad se ajusta por desintegración física hasta el día de medida.

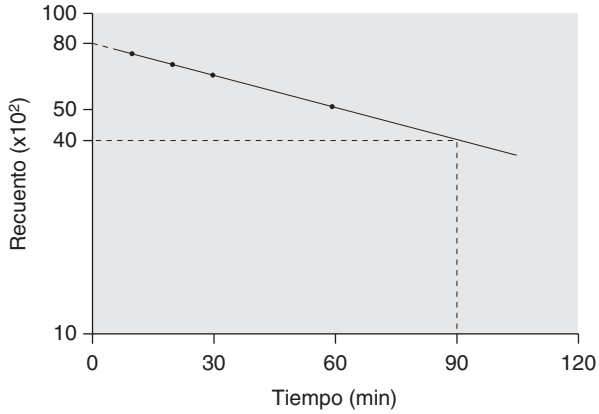


Figura 15.3. Aclaramiento del hierro plasmático. La actividad del ^{59}Fe en el plasma a 10, 20, 30 y 60 min se extrapola al eje vertical para obtener la actividad en el tiempo cero. El $T_{1/2}$ fue de 90 min.

Distribución del hierro corporal

Podemos construir una imagen global de la ferrocinética gracias al recuento de superficie con una sonda de centelleo situada sobre el hígado, el bazo, el sacro (para la médula ósea) y el corazón (si hay reserva sanguínea) tras una inyección intravenosa de ^{59}Fe. Si se hace el recuento durante varios días, es posible identificar focos de eritropoyesis en los primeros recuentos y focos de destrucción de hematíes en los últimos recuentos. Esta prueba apenas se realiza actualmente, aunque tiene cierta relevancia clínica para determinar la extensión de la eritropoyesis extramedular en el bazo antes de una esplenectomía.

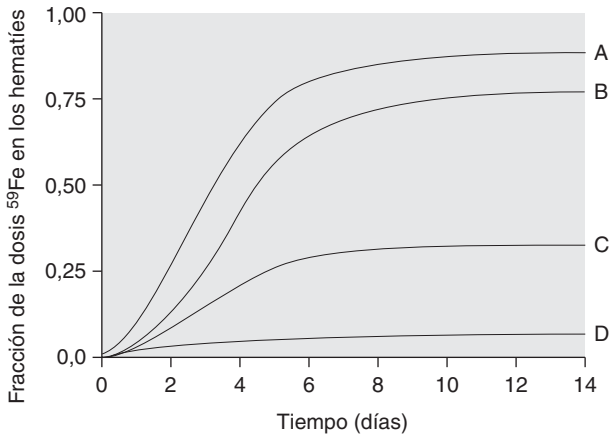


Figura 15.4. Utilización del hierro. Captación de ^{59}Fe por los hematíes en: A, déficit de hierro y policitemia; B, un sujeto normal; C, diseritropoyesis, y D, anemia aplásica grave.

Tabla 15.3. Patrones ferrocinéticos en distintas enfermedades

	Aclaramiento plasmático $T_{1/2}$	Utilización de hematíes[a]
Normal	60–140 min	80%
Déficit de hierro	Acortado	Aumentada (90%)
Anemia aplásica	Prolongado	Disminuida (10%)
Infección crónica	Ligeramente acortado	Normal
Diseritropoyesis	Ligeramente acortado	Disminuida (30%)
Mielofibrosis	Acortado	Disminuida (50%)
Anemia hemolítica	Acortado	Aumentada (85%)

[a] Se muestran los datos promedio, pero hay un amplio rango, según el estado y la gravedad de la enfermedad.

Donde hay instalaciones para usar el ^{52}Fe generado por ciclotrón y tomografía por emisión de positrones (PET) se pueden obtener imágenes de alta resolución de la distribución intra y extramedular del tejido eritropoyético. Esto es especialmente útil en los trastornos mieloproliferativos, para la transición diagnóstica de policitemia a mielofibrosis y para diferenciar la trombocitemia esencial de la trombocitosis reactiva[23]. Es también útil para identificar la eritropoyesis residual esquelética en la anemia aplásica.

ESTIMACIÓN DE LA VIDA MEDIA DE LOS HEMATÍES *IN VIVO*

Existe un gran número de artículos publicados acerca de la supervivencia de los hematíes en las anemias hemolíticas usando el marcaje de los hematíes con radioisótopos (v. la revisión de Bentley y Miller[24]). Aunque se hace ahora de manera menos frecuente que en el pasado, la medición de la supervivencia de los hematíes aún puede proporcionar datos importantes en casos de anemia en los que se sospecha una hemólisis aumentada pero no demostrada claramente por medio de otras pruebas. En el procedimiento habitual, se marca una población de hematíes circulantes de todas las edades («marcado aleatorio»). Por el contrario, en el «marcado de cohorte» se incorpora un radionucleido (p. ej., ^{59}Fe) a la hemoglobina durante su síntesis en los eritroblastos, y se mide la radioactividad en los hematíes que aparecen en la circulación como una cohorte de aproximadamente la misma edad. La vida media de los hematíes se puede calcular a partir de la medida de la renovación del hierro del hematíe[25], pero los resultados tienen que interpretarse con precaución debido a la reutilización del hierro derivado de los hematíes al final de su vida para la síntesis del hemo. El marcado aleatorio es un método mucho más práctico que el marcado de cohorte.

Método del cromo radioactivo (^{51}Cr)

El cromo radioactivo (^{51}Cr) es un emisor de rayos γ con una semivida de 27,8 días. Como marcador de hematíes, se utiliza en la forma de cromato sódico hexavalente. Tras atravesar la membrana de superficie de los hematíes, se reduce a la forma trivalente que se une a la proteína, preferentemente a las cadenas de polipéptido β de la hemoglobina[26]. En esta forma no se reutiliza ni se transfiere a otras células en la circulación.

La mayor desventaja del ^{51}Cr es que sufre una elución gradual de los hematíes mientras circulan; puede haber también una pérdida aumentada durante los primeros 1-3 días, y la incertidumbre de cuánto se ha perdido hace imposible calcular la vida media de los hematíes de una manera precisa. El cromo, tanto radioactivo como no, es tóxico para los hematíes, posiblemente por su acción oxidante; inhibe la glucólisis en los hematíes cuando se presenta a una concentración de 10 µg/ml o más[27] y bloquea la actividad de la glutatión transferasa cuando su concentración excede los 5 µg/ml[28]. Por tanto, la sangre no debería exponerse a más de 2 µg de cromo por ml de Hto.

El $Na_2{}^{51}CrO_4$ se encuentra en el mercado con una actividad específica de alrededor de 15-20 GBq/mg de Cr. Para su administración, hay que disolver la solución madre en NaCl (solución salina), 9 g/l (v. más abajo). No se debe usar el ACD como diluyente porque reduce el cromato a la forma crómica catiónica.

Al lavar los hematíes, hay que tener cuidado para evitar la lisis; puede ser necesario, sobre todo si la sangre contiene esferocitos, usar una solución ligeramente hipertónica (p. ej., NaCl, 12 g/l). Esto se debería usar siempre que una prueba de fragilidad osmótica haya demostrado lisis con NaCl, 9 g/l. En pacientes cuyo plasma contenga títulos altos de aglutininas frías de elevada amplitud térmica, se debe recoger la sangre en jeringuillas templadas, y repartirla en una solución de ACD previamente calentada a 37 °C; el marcado y el lavado en solución salina deben realizarse en una «habitación templada» a 37 °C.

Método

La técnica para marcar los hematíes es la misma que para la medición del VST (v. pág. 310)[29]. Para asegurar el mínimo daño posible a los hematíes, con la consiguiente pérdida precoz mínima y elución tardía, es muy importante

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

mantener la sangre a un pH óptimo. Esto se puede lograr añadiendo 10 volúmenes de sangre a 1,5 volúmenes de solución NIH-A ACD (v. pág. 587).

Para estudiar la supervivencia de los hematíes se recomienda 0,02 MBq por kg de peso corporal (una dosis total media de 2 MBq). Si se va a combinar con un gammagrafía de bazo o una medición de la reserva, se debe usar una dosis superior (4 MBq), teniendo presente que se deben añadir <2 µg de cromo por mililitro de Hto.

Tras la inyección, permitir que las células circulen en el paciente durante 10 min (o durante 60 min en pacientes con insuficiencia cardíaca o esplenomegalia, en los que la mezcla puede verse retrasada). Extraer entonces una muestra de sangre de una vena diferente a la usada para la inyección (o tras lavar la aguja con solución salina si se utiliza una aguja de mariposa) y mezclar con EDTA como anticoagulante. La radioactividad de esta muestra proporciona un valor basal para posteriores observaciones. Conservar parte de la suspensión de células marcadas que no hayan sido inyectadas en el paciente para que sirvan como estándar. Esto permite calcular el volumen sanguíneo si es necesario.

Tomar más muestras sanguíneas de 4-5 ml del paciente 24 h más tarde (día 1) y posteriormente a intervalos; la frecuencia de las muestras dependerá de la tasa de destrucción de los hematíes: en general, tres muestras entre el día 2 y el día 7, y después, dos muestras por semana durante la duración del estudio. Las mediciones se deben continuar hasta que haya desaparecido por lo menos la mitad de la radioactividad de la circulación.

Medir la hemoglobina o el Hto en una parte de cada muestra; lisar entonces las muestras con saponina, mezclar bien y repartir 1 ml en tubos de recuento, si es posible por duplicado.

Medición de la radioactividad

Estimar el porcentaje de supervivencia (del ^{51}Cr) en un día cualquiera (t) comparando la radioactividad de la muestra obtenida ese día con la muestra del día 0 (es decir, la muestra retirada 10 [o 60] min tras la inyección de células marcadas). Así, la supervivencia del ^{51}Cr en el día t (%) viene dada por la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{cpm/ml de sangre en el día t}}{\text{cpm/ml de sangre en el día 0}} \times 100$$

No se necesita ningún ajuste para la desintegración física del isótopo, siempre que el estándar se cuente en los minutos siguientes a la muestra del día t.

Realizar la medida con cualquier contador de centelleo de alta calidad; se deben registrar al menos 2.500 recuentos para alcanzar una precisión del ±2%.

Procesamiento de las mediciones de radioactividad

Antes de que los datos puedan ser interpretados y analizados, hay que considerar otros factores, aparte de la desintegración física, que están implicados en la desaparición de la radioactividad de la circulación. Hay dos procesos: las células marcadas con ^{51}Cr se pierden de la circulación por lisis, fagocitosis o hemorragia, y además, el ^{51}Cr es eluido de los hematíes intactos que aún están en la circulación.

Elución

La tasa de elución difiere poco de un individuo a otro. Se cree que varía en gran medida entre las diferentes enfermedades, especialmente cuando la vida media de los hematíes se ve considerablemente reducida. Sin embargo, en esos casos, la elución y la variación en la tasa de elución carecen de importancia. La tasa de elución también se ve influenciada por la técnica, especialmente por la solución anticoagulante en la que se mantiene la sangre previamente al marcaje. Con la solución NIH-A ACD, la tasa de elución es de alrededor del 1% al día[29].

Pérdidas tempranas

En algunas ocasiones, aparte de la elución, que ocurre continuamente y de una manera relativamente lenta y constante, se puede perder hasta el 10% de ^{51}Cr en las primeras 24 h. La causa de esta gran pérdida temprana es desconocida, pudiendo estar implicados varios componentes. Si esta pérdida principal no ocurre más allá de los primeros 2 días, se considera por lo general como un artefacto, en el sentido de que no denota una tasa aumentada de lisis *in vivo*, y puede ser, y de hecho es, ignorada mediante un retrazado de las cifras como se describe en la página 318. Este procedimiento es aceptable, al menos para estudios clínicos, pero no tiene en cuenta la posibilidad de que una pequeña proporción de hematíes presentes se lisa rápidamente. En la práctica diaria se calcula el $T_{50}Cr$[i] (es decir, el tiempo que necesita la concentración de ^{51}Cr en sangre para disminuir al 50% de su valor inicial) tras corregir los datos para la desintegración física pero no para la elución. La gran objeción para el uso del $T_{50}Cr$ es que puede ser engañoso sin información adicional en el patrón de la curva de supervivencia. Con la técnica descrita anteriormente, el valor medio del T_{50} en sujetos normales es de 30 días, con un rango de 25-33 días (tabla 15.4).

Corrección de la elución

Cuando hay una hemólisis marcada, la elución tiene poca importancia y puede ser ignorada. Pero cuando la hemólisis no está muy aumentada, es esencial corregir la elución. Esto se puede hacer multiplicando la supervivencia medida por los factores dados en la tabla 15.4.

Curvas de supervivencia

La supervivencia normal de los hematíes (corregida por la elución) estará en el rango que se muestra en la figura 15.5. Cuando la supervivencia está reducida, se debe dibujar una curva de supervivencia y, de ella, obtener la vida media de los hematíes.

Trazar las cifras de % de radioactividad o tasas de recuento por mililitro de sangre completa (corregidas por desintegración física y por elución) en un papel milimetra-

[i] El t_{50} se usa más que el $T_{1/2}$ porque la eliminación del marcaje no es una fracción exponencial constante de la cantidad original.

Tabla 15.4. Rango normal de las curvas de supervivencia del ^{51}Cr con corrección de la elución

Día	% ^{51}Cr (corregido para la desintegración; no corregido para la elución)	Factores de corrección de la elución[a]
1	93–98	1,03
2	89–97	1,05
3	86–95	1,06
4	83–93	1,07
5	80–92	1,08
6	78–90	1,10
7	77–88	1,11
8	76–86	1,12
9	74–84	1,13
10	72–83	1,14
11	70–81	1,16
12	68–79	1,17
13	67–78	1,18
14	65–77	1,19
15	64–75	1,20
16	62–74	1,22
17	59–73	1,23
18	58–71	1,25
19	57–69	1,26
20	56–67	1,27
21	55–66	1,29
22	53–65	1,31
23	52–63	1,32
24	51–60	1,34
25	50–59	1,36
30	44–52	1,47
35	39–47	1,53
40	34–42	1,60

[a] Para corregir por elución, multiplicar el % de ^{51}Cr por el factor de elución de ese día en concreto.

do aritmético y semilogarítmico e intentar trazar líneas rectas que pasen por los puntos de los datos.

1. Si se puede ajustar una línea recta en el trazo aritmético, la vida media de los hematíes viene dada por el punto de tiempo en el que la línea o su extensión corta la abscisa (fig. 15.6).

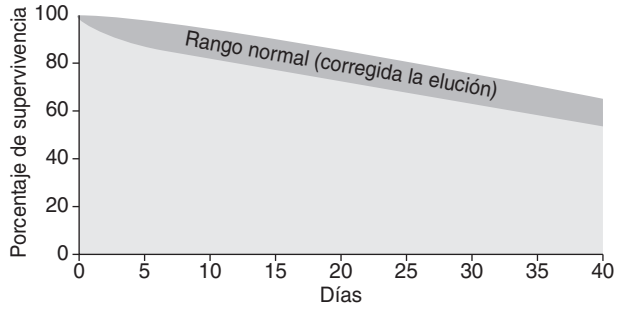


Figura 15.5. Supervivencia de los hematíes con ^{51}Cr. El área sombreada muestra el rango normal.

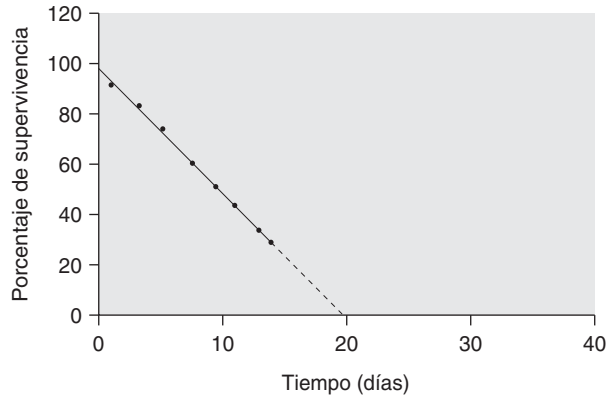


Figura 15.6. Curva de supervivencia de los hematíes con ^{51}Cr. Paciente con esferocitosis hereditaria. Los resultados dan una línea recta cuando se trazan en papel milimetrado aritmético. El promedio de vida media celular está indicado por el punto en el que su prolongación corta la abscisa (20 días).

2. Por norma, sin embargo, la línea recta se ajusta mejor en el trazado semilogarítmico; la vida media de los hematíes se puede leer como el exponencial e^{-1}, que es el tiempo en el que el 37% de las células aún sobreviven (fig. 15.7), o calcularse multiplicando la semivida de la línea ajustada por la inversa del logaritmo neperiano de 2 (0,693) (es decir, multiplicando por 1,44).

El proceso de ajuste de la curva programado por ordenador es más preciso, pero para fines clínicos no es probable que mejore la exactitud global de los resultados.

Interpretación de las curvas de supervivencia

En las anemias hemolíticas autoinmunes, la pendiente de eliminación es, por lo general, considerablemente curvilínea cuando se trazan los datos en papel milimetrado aritmético. La destrucción de los hematíes es típicamente aleatoria y la curva de eliminación es, por tanto, exponencial, y los datos nos dan una línea recta cuando se trazan en un papel milimetrado semilogarítmico.

En algunos casos de anemia hemolítica (posiblemente sólo cuando haya defectos intracorpusculares), la curva de supervivencia parece constar de dos componentes: una pendiente inicial pronunciada seguida de una pendiente

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

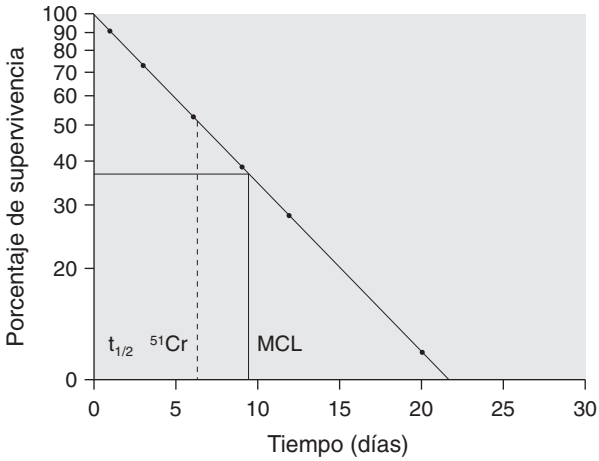


Figura 15.7. Curva de supervivencia de los hematíes con ^{51}Cr. Paciente con anemia hemolítica autoinmune. Los resultados se han trazado en papel milimetrado semilogarítmico, y el promedio de vida media se leyó en el momento en el que el 37% de las células todavía sobrevivían (9–10 días). El CrT_{50} fue de 6-7 días. MCL, promedio de vida media celular.

descendente mucho menos marcada. Esto sugiere la presencia de células de una vida media muy variada. Este tipo de curva de «población doble» se ve en la hemoglobinuria paroxística nocturna, en la anemia de células falciformes, en algunos casos de anemia hemolítica hereditaria con déficit enzimático y cuando las células marcadas son una mezcla de células transfundidas normales y células de vida corta del paciente. El promedio de vida media de la población celular completa se puede deducir trazando los puntos en un papel milimetrado semilogarítmico, como se ha descrito previamente. La proporción de células que pertenecen a la población de vida más larga se puede estimar trazando los datos en un papel milimetrado aritmético y extrapolando la pendiente menos pronunciada a la ordenada; la vida media de la población se puede estimar extendiendo la misma pendiente a la abscisa (fig. 15.8). La vida media de las células de vida corta se puede deducir de la fórmula:

$$MCL = \frac{\%S}{\frac{100}{MCL_T} - \frac{\%L}{MCL_L}}$$

donde S = población de vida corta; L = población de vida más larga; T = población celular total, y MCL = promedio de vida media celular.

Corrección de las pérdidas tempranas

El método más sencillo es ignorar las pérdidas tempranas, considerando como el 100% la radioactividad aún presente al final de las primeras 24-48 h. Como alternativa, se puede usar el siguiente método, que tiene la ventaja de que la pendiente de la curva de supervivencia no se ve tan alterada. Trazar los datos en un papel milimetrado aritmético, extrapolar la línea de la pendiente más allá de la parte más inclinada inicial a la ordenada y tomar el punto de intersección como el 100%; calibrar entonces la escala de ordenadas adecuadamente.

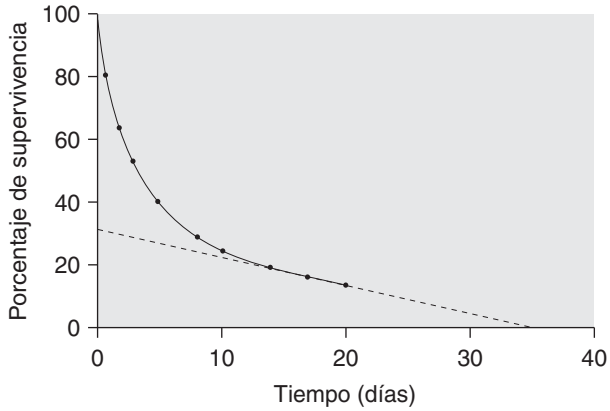


Figura 15.8. Curva de supervivencia de los hematíes con ^{51}Cr en la que se observa una «población doble». Trazando los datos en un papel milimetrado semilogarítmico como se describe en la figura 15.6, el promedio de vida media celular (MCL) se reducía a 5 días. Al trazarlos en el papel milimetrado aritmético, por extrapolación de la pendiente menos inclinada a la ordenada, se deduce que aproximadamente el 30% de los hematíes pertenecen a una población y, por extrapolación de la misma pendiente a la abscisa, la MCL de la población que se deduce es de 35 días. La vida media del 70% de células restante se calcula que es de 3,6 días (v. fórmula). El Cr T_{50} fue de 3-4 días.

Cambios en el volumen sanguíneo

No es necesario corregir la medida de radioactividad por mililitro de sangre completa de las alteraciones en el Hto siempre que el volumen total de sangre se mantenga constante a lo largo del estudio. Sin embargo, si se sospecha que el VS puede cambiar (p. ej., en pacientes que sufran hemorragia o que sean transfundidos), se deben llevar a cabo determinaciones seriadas del VS y multiplicar la radioactividad observada por el VS observado y dividirla por el VS inicial. En la práctica, si un paciente recibe una transfusión sanguínea durante un estudio de supervivencia, se puede asumir, como norma general, que el VS habrá vuelto a su nivel pretransfusional en 24-48 h.

Corrección de los datos de supervivencia por pérdida de sangre

Cuando hay una pérdida de sangre relativamente constante durante el estudio de supervivencia de los hematíes, la vida media real de los hematíes se puede obtener con la siguiente ecuación:

$$\text{MCL real} = \frac{Ta \times VE}{VE - (Ta \times L)}$$

donde Ta = tiempo evidente de MCL (días): VE = volumen eritrocitario (ml), y L = tasa media de pérdida de hematíes (ml/día).

Vida media normal de los hematíes

La vida media normal en sujetos sanos es de aproximadamente 120 días.

PRUEBA DE COMPATIBILIDAD

El comportamiento de las células de un donante marcadas en un receptor proporcionará una importante información acerca de la compatibilidad o no de la sangre del donante:

1. Cuando las pruebas serológicas sugieren que todos los donantes normales son incompatibles.
2. Cuando, en presencia de un aloanticuerpo, no se puede encontrar ningún donante no reactivo.
3. Cuando el receptor haya tenido una reacción hemolítica transfusional inexplicable.

Método

Extraer 1-2 ml de sangre de la bolsa del donante usando una técnica estéril. Marcar 0,5 ml de los hematíes con 0,8 MBq de ^{51}Cr, 2 MBq de ^{111}In o 2 MBq de ^{99m}Tc de la forma estándar (v. pág. 309) y administrarlos al receptor. Extraer 5-10 ml de sangre en EDTA o heparina a los 3, 10 y 60 min tras la inyección, de una vena diferente a la utilizada para la inyección. Preparar muestras de 1 ml en viales de recuento. Centrifugar el resto de las muestras y pipetear 1 ml del plasma en viales de recuento. Medir la radioactividad de la forma habitual. Calcular la actividad en las muestras de sangre y plasma como un porcentaje de la muestra de sangre a los 3 min[29].

Interpretación

Con sangre compatible, la radioactividad en la muestra del minuto 60 es, como media, el 99% de la de la muestra a los 3 min, aunque puede variar entre el 94 y el 104%. Si la radioactividad sanguínea a los 60 min no es menor del 70%, y la actividad plasmática no es más del 3%, las células del donante se pueden transfundir con un riesgo mínimo[29].

Determinación de los lugares de destrucción de hematíes utilizando el ^{51}Cr

Debido a que el ^{51}Cr es un emisor de rayos γ, los lugares de destrucción de los hematíes, con especial mención al hígado y al bazo, se pueden determinar mediante el recuento en superficie *in vivo*, utilizando un contador de centelleo blindado situado, respectivamente, sobre el corazón, el bazo y el hígado. Este procedimiento es laborioso, pero de vez en cuando proporciona información clínica útil acerca del papel del bazo en los diversos tipos de anemia hemolítica, especialmente para predecir la respuesta a la esplenectomía[30].

VISUALIZACIÓN DEL BAZO MEDIANTE GAMMAGRAFÍA DE CENTELLEO

La forma anatómica de los órganos, incluido el bazo, se suele estudiar en los servicios de radiología o de medicina nuclear mediante resonancia magnética (RM), tomografía computarizada (TC) o ultrasonidos. La imagen de los hematíes marcados con radioisótopos proporciona un método funcional alternativo. Si los hematíes sanguíneos marcados con ^{99m}Tc se dañan por calor, entonces el bazo los elimina de forma selectiva. El coloide marcado con ^{99m}Tc también es eliminado de la circulación por el bazo, aunque esto no es tan específico, porque también se elimina gracias a las células reticuloendoteliales del hígado y de cualquier otro lugar. La tasa de absorción del isótopo por parte del bazo es una medida de su funcionalidad (v. más abajo). La imagen por gammagrafía se empieza por lo general 1 h después de la inyección de las células dañadas, pero puede realizarse hasta 3-4 h después. La acumulación de la radioactividad en el bazo tras la administración de células marcadas dañadas por calor nos proporciona así una forma de demostrar su tamaño y posición, si está ausente o su funcionalidad está reducida, y la presencia de esplenúnculos. También se pueden obtener gammagrafías satisfactorias con ^{51}Cr o ^{111}In.

Método

Con el ^{99m}Tc como marcador, se realiza un preestañado *in vivo* mediante una inyección de un compuesto de estaño como se describe en la página 310. Extraer entonces 5-10 ml de sangre en un frasco estéril que contenga 100 UI de heparina. Lavar dos veces en NaCl, 9 g/l (solución salina) estéril, centrifugar a 1.200-1.500 g durante 5-10 min. Transferir 2 ml del hematocrito a un frasco de cristal de 30 ml con un tapón de rosca; calentar el frasco en un baño de agua a temperatura constante de 49,5-50 °C durante exactamente 20 min, agitando vigorosamente de vez en cuando. Lavar las células en solución salina hasta que el sobrenadante quede libre de hemoglobina y descartar el sobrenadante final. Marcar con 40 MBq de ^{99m}Tc según el método descrito en la página 310. Después de dejarlo reposar durante 5 min, lavar dos veces en solución salina. Volver a suspender en unos 10 ml de solución salina e inyectarlo tan pronto como sea posible. Tras una hora aproximadamente, llevar a cabo la gammagrafía en una gammacámara[31].

Función esplénica

La información de la actividad esplénica se puede obtener midiendo la tasa de aclaramiento de la circulación de los hematíes marcados dañados por calor. Se toma una muestra de sangre exactamente 3 min tras el momento intermedio de la inyección, y se recogen muestras posteriores a intervalos de 5 min durante 30 min, a los 45 min, y una muestra final a los 60 min. La radioactividad de cada muestra se mide y se expresa como un porcentaje de la radioactividad de la muestra a los 3 min. Los resultados se trazan en un papel milimetrado semilogarítmico, considerando la muestra a los 3 min como el 100% de radioactividad. Para tener resultados constantes, se necesita una técnica cuidadosamente estandarizada, para asegurar que los hematíes se dañan en la misma medida.

La curva de desaparición es, por norma, exponencial (fig. 15.9). La pendiente inicial refleja el flujo sanguíneo esplénico; la tasa del flujo sanguíneo se calcula como la inversa del tiempo que necesita la radioactividad para caer

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

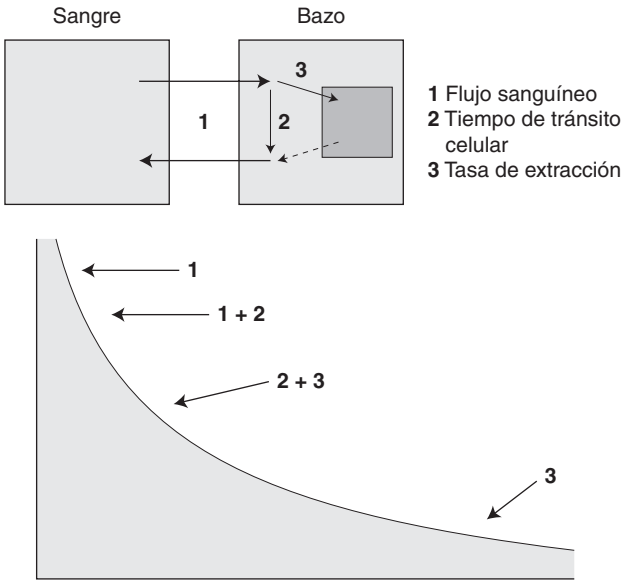


Figura 15.9. Curva de desaparición de los hematíes dañados por calor. La curva muestra la secuencia de flujo sanguíneo, de la reserva transitoria, del secuestro y del atrapamiento irreversible de las células.

a la mitad de su valor a los 3 min (es decir, 0,693/$t_{1/2}$) donde 0,693 es el logaritmo neperiano de 2.

Cuando el bazo funciona con normalidad, el $t_{1/2}$ es de 5-15 min, y la fracción de flujo sanguíneo esplénico es de 0,05-0,14 ml/min (es decir, 5-14% de la sangre circulante por minuto). La tasa de aclaramiento está considerablemente prolongada en la trombocitemia y, en ocasiones, asociada a la atrofia esplénica, tal como ocurre con la anemia de células falciformes, la enfermedad celíaca o la dermatitis herpetiforme[17]. Esto proporciona, por tanto, cierta información acerca de la funcionalidad esplénica. Sin embargo, la curva de desaparición es un complejo de al menos dos componentes. El primero (mencionado antes) refleja el flujo sanguíneo esplénico, y el segundo mide principalmente el atrapamiento celular, consecuencia tanto del secuestro transitorio como de la fagocitosis con retirada irreversible de las células de la circulación[32,33]. La medición de la fagocitosis sola se obtiene de manera más fiable con los hematíes recubiertos con inmunoglobulina G (IgG)-(anti-D)[34].

Imágenes leucocitarias

El mayor valor diagnóstico de la gammagrafía con granulocitos marcados con ^{111}In es localizar lugares específicos de infección y abscesos y, en pacientes con fiebre de origen desconocido, descartar una causa infecciosa de la fiebre[35]. Para esto es necesario preparar un concentrado de granulocitos separados de los demás leucocitos (v. pág. 58). A continuación, se marcan con ^{111}In mediante un procedimiento similar al del marcado de las plaquetas (v. pág. 321)[36] y se administran. Los lugares donde se acumulan los granulocitos se ponen de manifiesto en una exploración con gammacámara.

Imágenes diversas

Además de los radioisótopos expuestos previamente, existen otros radioisótopos que se pueden usar para proporcionar información en los trastornos hematológicos. Por ejemplo, la ^{18}F-FDG (fluorin-18 fluorodesoxiglucosa), un trazador del metabolismo de la glucosa, con una tomografía por emisión de positrones (PET), puede ser útil para la valoración del metabolismo del tumor[37,38]. La información obtenida puede ayudar a la estadificación clínica de los pacientes con enfermedades malignas, incluyendo el linfoma. El tejido maligno muestra una captación aumentada de este trazador, y esta información se puede usar para controlar el progreso de los pacientes que están recibiendo quimioterapia.

De la misma manera, otros estudios radiológicos más habituales pueden ser útiles para el tratamiento de las enfermedades hematológicas. Por ejemplo, la RM puede ayudar a controlar los progresos de los pacientes con linfoma y mieloma. En el tratamiento de los pacientes con sobrecarga de hierro, la exploración con RM (por el método específico de imagen T2) puede proporcionar información importante del hierro hepático o cardíaco, que se puede utilizar para optimizar la terapia de quelación del hierro[39].

MEDICIÓN DE LA PÉRDIDA SANGUÍNEA POR EL TRACTO GASTROINTESTINAL

El método del ^{51}Cr para el marcado de hematíes se puede emplear para medir cuantitativamente las pérdidas de sangre por el tracto gastrointestinal ya que el ^{51}Cr ni se excreta ni es reabsorbido de forma valorable. Por consiguiente, cuando la sangre contiene hematíes marcados con ^{51}Cr, la radioactividad fecal es de intensidad muy baja, a menos que haya habido un sangrado en algún lugar del tracto gastrointestinal. La medición de la radioactividad fecal nos da entonces una medida fiable del alcance de la pérdida de sangre.

Método

Marcar la sangre del propio paciente con aproximadamente 4 MBq de ^{51}Cr, como se describe en la página 309. Durante cada día de la prueba, recoger las heces en cartón encerado o en plástico. Preparar un estándar mediante la adición de un volumen medido (3-5 ml) de la sangre del paciente, recogido cada día, en aproximadamente 100 ml de agua en un cartón similar. Comparar la radioactividad de las muestras de heces y su correspondiente estándar diario en un sistema de recuento de gran volumen (v. pág. 308). Entonces:

$$\text{Volumen de sangre en heces (en ml)} = \frac{\text{cpm/ heces recogidas en 24 h}}{\text{cpm/ ml de estándar}}$$

La pérdida de sangre de cualquier otro origen (p. ej., operación quirúrgica o menstruación) se puede medir de

manera similar contando las torundas de algodón, los apósitos y todo lo demás que haya depositado en el cartón. Sin embargo, no es posible medir las pérdidas de sangre o de hemoglobina en la orina (hematuria o hemoglobinuria) por este método, porque el ^{51}Cr libre se excreta normalmente por orina.

También se ha descrito otro procedimiento de imagen en el que la sangre se marca con ^{99m}Tc y se realiza una gammagrafía de centelleo de campo grande a los 60-90 min y, si fuera necesario, otra vez a intervalos durante 24 h[40].

MEDICIÓN DE LA VIDA MEDIA DE LAS PLAQUETAS

Principio

El procedimiento para medir la vida media de las plaquetas es, en términos generales, similar al de la supervivencia de los hematíes (v. pág. 312). El ICSH recomienda un método utilizando plaquetas marcadas con ^{111}In[41]. A continuación se describe una modificación de este método, para usarlo especialmente en el recuento bajo de plaquetas[42].

Método

Extraer 51 ml de sangre y guardarla en 9 ml de NIH-A ACD (v. pág. 587); se necesita una cantidad relativamente menor si el recuento de plaquetas es normal o alto. Distribuir la sangre de manera equitativa en tres tubos de poliestireno de 30 ml, cada uno con 2 ml de hidroxietil-almidón 60 g/l (Hespan, Bristol Myers Squibb). Mezclar y centrifugar inmediatamente a 150 g durante 10 min. Transferir el plasma sobrenadante rico en plaquetas a tubos de centrífuga limpios y añadir 1 volumen de ACD a 10 volúmenes de plasma rico en plaquetas. Si fuera necesario, centrifugar otra vez a 150 g durante 5 min para eliminar los hematíes residuales[42].

Centrifugar el plasma rico en plaquetas a 640 g durante 10 min para obtener concentrados de plaquetas. Quitar con cuidado el plasma sobrenadante pero no desecharlo. Añadir 1 ml de este plasma pobre en plaquetas a los concentrados de plaquetas, dar unos golpecitos suaves a los tubos para volver a ponerlos en suspensión y combinar los contenidos.

Preparar una solución de tropolona, 4,4 mmol/l (0,54 mg/ml) en tampón HEPES-salino, pH 7,6 (v. pág. 589). Mezclar 0,1 ml con 8 MBq (250 µCi) de $Cl^{111}In$ en menos de 50 µl de HCl, 40 mmol/l. Añadir la suspensión de plaquetas mezclando cuidadosamente y dejarla a temperatura ambiente durante 5 min. Añadir entonces 5 ml de plasma pobre en plaquetas. Centrifugar a 640 g durante 10 min. Eliminar el sobrenadante y volver a suspender los sedimentos de plaquetas en 5 ml de plasma pobre en plaquetas. Coger la suspensión de plaquetas con una jeringuilla de plástico de 10 ml.

Añadir 0,5 ml de la suspensión de plaquetas a 100 ml de agua en un matraz volumétrico y guardarlo como estándar. Pesar la jeringuilla, inyectar las plaquetas en el paciente con una aguja tipo mariposa, y volver a pesar.

$$\text{Volumen inyectado} = \text{peso (g)} \times 1/1{,}015$$

donde 1,015 es la gravedad específica del plasma.

Extraer muestras de 5 ml de sangre en EDTA al minuto 45, a las 2, 3 y 4 h de la inyección, y después diariamente durante 10 días.

Medir el hematocrito (v. pág. 28) y centrifugar parte de cada muestra a 1.500 g durante 10 min para obtener plasma libre de células.

Lisar parte de la muestra de sangre completa con saponina al 2% y medir la radioactividad en 1 ml de la muestra de sangre completa, de plasma y de estándar diluido.

De la radioactividad en 1 ml de la muestra de sangre total, restar la radioactividad en 1 ml de plasma, corregido con el valor real de plasma en 1 ml de sangre total (es decir, 1-Hto).

Cálculo de la recuperación plaquetaria en cada tiempo de muestreo

$$\frac{\text{cpm/ml de muestra sanguínea (corregida para la actividad plasmática)} \times \text{VST (ml)}^{j}}{\text{cpm/ml estándar} \times \text{dilución del estándar} \times \text{volumen inyectado}}$$

Análisis de los datos

Trazar la supervivencia porcentual frente al tiempo en un papel milimetrado aritmético y calcular el tiempo de supervivencia igual que para la supervivencia de los hematíes (v. pág. 312).

Según este método, la vida media normal de las plaquetas es de 8-10 días, pero la validez del análisis se basa en el supuesto de que el volumen sanguíneo es constante y el patrón de desaparición de las plaquetas de la circulación se mantiene constante durante el curso del estudio.

Supervivencia plaquetaria en enfermedades

En la púrpura trombocitopénica idiopática, la vida media de las plaquetas está reducida considerablemente. También está acortada en las coagulopatías de consumo y en la púrpura trombótica trombocitopénica. En la trombocitopenia, debida a una producción defectuosa de las plaquetas, la vida media debería ser normal, siempre que no se perdieran las plaquetas por hemorragia durante el curso del estudio. En la trombocitopenia asociada a esplenomegalia, la recuperación de las plaquetas marcadas inyectadas es baja, pero su supervivencia es por lo general casi normal. Gracias a la gammagrafía cuantitativa con ^{111}In, es posible medir la reserva esplénica de plaquetas y distinguir la importancia relativa del almacenamiento y de la destrucción de plaquetas en el bazo[44-46]. La reserva de plaquetas del bazo es, por lo general, del 30% de la población plaquetaria total, y se cree que cada plaqueta pasa un tercio de su vida en el bazo. El volumen de la reserva aumenta en la esplenomegalia, llevando a una trombocitopenia pero no necesariamente a una reducción de la vida media plaquetaria.

[j] Si no se mide el volumen sanguíneo total, se puede obtener una aproximación por el peso y la altura del sujeto[43].

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wagner HN, Szabo Z, Buchanan JW 1995 Principles of nuclear medicine. Saunders, Philadelphia.
2. Maisey MN, Britton KE, Collier BD 1998 Clinical nuclear medicine, 3rd ed. Chapman and Hall, London.
3. Lewis SM, Bayly RJ (eds) 1986 Methods in hematology14: radionuclides in haematology. Churchill Livingstone, Edinburgh.
4. National Radiation Protection Board 2000 The ionizing radiation (medical exposure) regulations 2000. HSE Book, London.
5. ARSAC 1993 Notes for guidance on the administration of radiopharmaceuticals and use of sealed radioactive sources. National Radiation Protection Board, Chilton, Didcot Oxon OX11 0RQ. See also website *www. ARSAC>NRPB.*
6. Alavi A (ed) 2002 Impact of FDG-PET imaging on the practice of medicine. Seminars in Nuclear Medicine 32:1-76.
7. Jamar F Lonneux M 2003 Positron emission tomography in haematology. In Peters AM (ed) Nuclear medicine in radiological diagnosis, ,p 519-529, Martin Dinitz, London.
8. Bentley SA, Lewis SM 1976 The relationship between total red cell volume, plasma volume and venous haematocrit. British Journal of Haematology 33:301-307.
9. International Committee for Standardization in Haematology 1980 Recommended methods for measurements of red-cell and plasma volume. Journal of Nuclear Medicine 21: 793-800.
10. Ferrant A, Lewis SM, Szur L 1974 The elution of 99mTc from red cells and its effect on red cell volume measurement. Journal of Clinical Pathology 27:983-985.
11. Goodwin DA 1978 Cell labelling with oxine chelates of radioactive metal ions: techniques and clinical implications. Journal of Nuclear Medicine 19:557-559.
12. Osman S, Danpure HJ 1987 A simple in vitro method of radiolabelling human erythrocytes in whole blood with 113mIn-tropolonate. European Journal of Haematology 39:125-127.
13. Berlin NI, Lewis SM 2000 Measurement of total red-cell volume relative to lean body mass for diagnosis of polycythaemia. American Journal of Clinical Pathology. 114:922-926.
14. International Council for Standardization in Haematology (Expert Panel on Radionuclides) 1995 Interpretation of measured red cell mass and plasma volume in adults. British Journal of Haematology 89:747-756.
15. Lukaski HC, Johnson PE, Bolunchuk WW, et al 1985 Assessment of fat-free mass using bioelectrical impedance measurements of the human body. American Journal of Clinical Nutrition 41:810-817.
16. Lund CJ, Sisson TRC 1958 Blood volume and anemia of mother and baby. American Journal of Obstetrics and Gynecology 76:1013-1023.
17. Pettit JE 1977 Spleen function. Clinics in Haematology 6: 639-656.
18. Bateman S, Lewis SM, Nicholas A, et al 1978 Splenic red cell pooling: a diagnostic feature in polycythaemia. British Journal of Haematology 40:389-396.
19. Hegde UM, Williams ED, Lewis SM, et al 1973 Measurement of splenic red cell volume and visualization of the spleen with 99mTc. Journal of Nuclear Medicine 14:769-771.
20. Miller JH 1987 Technetium-99m-labelled red blood cells in the evaluation of the liver in infants and children. Journal of Nuclear Medicine 28:1412-1418.
21. Front D, Israel O 1981 Tc-99m-labelled red blood cells in the evaluation of vascular abnormalities. Journal of Nuclear Medicine 22:149-151.
22. Cavill I 1986 Plasma clearance studies. Methods in Hematology 14:214-244.
23. Peters AM, Swirsky DM 1998 Blood disorders. In: Maisey MN, Britton KE, Collier BD (eds) Clinical nuclear medicine, 3rd ed. Chapman and Hall, London.
24. Bentley SA, Miller DT 1986 Radionuclide blood cell survival studies. Methods in Hematology 14:245-262.
25. Ricketts C, Cavill I, Napier JAF 1977 The measurement of red cell lifespan using 59Fe. British Journal of Haematology 37:403-408.
26. Pearson HA 1963 The binding of 51Cr to hemoglobin. I. In vitro studies. Blood 22:218-230.
27. Jandl JH, Greenberg MS, Yonemoto RH, et al 1956 Clinical determination of the sites of red cell sequestration in hemolytic anemias. Journal of Clinical Investigation 35:842-867.
28. Koutras GA, Schneider AS, Hattori M, et al 1965 Studies of chromated erythrocytes: mechanisms of chromate inhibition of glutathione reductase. British Journal of Haematology 11:360-369.
29. International Committee for Standardization in Haematology 1980 Recommended methods for radioisotope red-cell survival studies. British Journal of Haematology 45:659-666.
30. International Committee for Standardization in Haematology 1975 Recommended methods for surface counting to determine sites of red-cell destruction. British Journal of Haematology 30:249-254.
31. Royal HD, Brown ML, Drum DE, et al 1998 Procedure guideline for hepatic and splenic imaging. Journal of Nuclear Medicine 39:1114-1116.
32. Peters AM, Ryan PFJ, Klonizakis I, et al 1981 Analysis of heat-damaged erythrocyte clearance curves. British Journal of Haematology 49:581-586.
33. Peters AM, Ryan PFJ, Klonizakis I, et al 1982 Kinetics of heat damaged autologous red blood cells. Scandinavian Journal of Haematology 28:5-14.
34. Peters AM, Walport MJ, Elkon KB, et al 1984 The comparative blood clearance kinetics of modified radiolabelled erythrocytes. Clinical Science 66:55-62.
35. Kjaer A, Lebech A-M 2002 Diagnostic value of ^{111}In-granulocyte scintigraphy in patients with fever of unknown origin. Journal of Nuclear Medicine 43:140-144.
36. Buscombe J 1998 Infection. In: Maisey MN, Britton KE, Collier BD (eds) Clinical nuclear medicine, 3rd ed. Chapman and Hall, London.
37. Weber WA, Schwaiger M, Avril N 2000 Quantitative assessment of tumour metabolism using FDG-PET imaging. Nuclear Medicine and Biology 27:683-687.
38. Schöder H, Larson SM, Yeung HW 2004 PET/CT in oncology: Integration into clinical management of lymphoma, melanoma, and gastrointestinal malignancies. Journal of Nuclear Medicine 45:72S-81S.
39. Anderson LJ, Wonke B, Prescott E et al 2002 Comparison of effects of oral deferiprone and subcutaneous desferrioxamine on myocardial iron concentrations and ventricular function in beta-thalassaemia. Lancet 360:516-520.
40. Ford PV, Bartold SP, Fink-Bennett DM, et al 1999 Procedure guideline for gastrointestinal bleeding and Meckel's diverticulum scintigraphy. Journal of Nuclear Medicine 40:1226-1232.

41. International Committee for Standardization in Haematology 1988 Recommended methods for ^{111}In platelet survival studies. Journal of Nuclear Medicine 29:564-566.
42. Danpure HJ, Osman S, Peters AM 1990 Labelling autologous platelets with ^{111}In tropolonate for platelet kinetic studies: limitations imposed by thombocytopenia European Journal of Haematology 45:223-230.
43. Hurley PJ 1975 Red cell and plasma volumes in normal adults. Journal of Nuclear Medicine 16:46-52.
44. Peters AM, Swirsky DM 1998 Blood disorders In: Maisey MN, Britton KE, Collier BD (ed) Clinical nuclear medicine, 3rd ed. pp. 525-539, Chapman and Hall, London.
45. Peters AM, Saverymuttu SH, Bell RN, et al 1985 The kinetics of short-lived indium-111 radiolabelled platelets. Scandinavian Journal of Haematology 34:137-145.
46. Peters AM, Saverymuttu SH, Wonke B, et al 1984 The interpretation of platelet kinetic studies for the identification of site of abnormal platelet destruction. British Journal of Haematology 57:637-649.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

16 Exploración de la hemostasia

Mike Laffan y Richard Manning

Componentes de la hemostasia normal 326
- El vaso sanguíneo 326
- Plaquetas 327
- Coagulación sanguínea 328
- Inhibidores de la coagulación 331
- Sistema fibrinolítico 331

Aproximación general a la investigación de la hemostasia 332
- Aproximación clínica 332
- Fundamentos de los análisis de laboratorio 332

Equipamiento 334

Variables preanalíticas, incluyendo la recogida de la muestra 335
- Calibración y control de calidad 337
- Rendimiento de las pruebas de coagulación 338
- Monitorización de ensayos y detección de parámetros de valoración 338
- Análisis de ensayos 339

Estudio básico de la coagulación 342
- Tiempo de protrombina 342
- Tiempo de tromboplastina parcial activado 343
- Determinación del fibrinógeno 344
- Análisis del fibrinógeno (técnica de Clauss) 344
- Recuento plaquetario 345

Interpretación de las pruebas de primera línea 345

Exploraciones de segunda línea 345
- Pruebas de corrección utilizando el TP o el TTPA 348
- Pruebas de corrección utilizando el tiempo de trombina 349
- Tiempo de reptilase o ancrod 349

Investigación de trastornos hemorrágicos resultantes de un déficit o defecto de un factor de la coagulación 349
- Principios generales de los bioensayos en línea paralela de los factores de coagulación 350
- Ensayos basados en el tiempo de protrombina 351
- Ensayos basados en el tiempo de tromboplastina parcial activada 351
- Pruebas necesarias para monitorizar el tratamiento sustitutivo en los déficits y alteraciones funcionales de los factores de la coagulación 353

Investigación de un paciente con un anticoagulante circulante (inhibidor) 354
- Detección de un inhibidor circulante (anticoagulante) basado en el TTPA 354
- Medición cuantitativa de los inhibidores del factor VIII:C 355

Investigación de un paciente con sospecha de afibrinogenemia, hipofibrinogenemia o disfibrinogenemia 356
- Estimación del fibrinógeno 356

Defectos de la hemostasia primaria 357
- Investigación de los trastornos vasculares de la hemostasia 357
- Tiempo de sangría 357
- Método estandarizado con dispositivo comercial 357
- Método de Ivy 358
- Pruebas de laboratorio de la función plaquetaria–factor de Von Willebrand 358

Investigación de la sospecha de enfermedad de Von Willebrand 359
- Ensayo de inmunoabsorción enzimática para el antígeno del factor Von Willebrand 359
- Ensayo inmunoturbidométrico del antígeno del factor Von Willebrand 360
- Ensayo del cofactor de ristocetina 360
- Ensayo de unión de colágeno (ELISA) 362
- Análisis de multímeros del antígeno de factor Von Willebrand en muestras de plasma 363
- Investigación de la sospecha de un trastorno de la función plaquetaria, heredado o adquirido 365
- Estudios de laboratorio de las plaquetas y de la función plaquetaria 365
- Agregación plaquetaria 366
- Estudios posteriores de la función plaquetaria 372

Prueba de solubilidad del coágulo para el estudio del factor XIII 372

Coagulación intravascular diseminada 373
- Detección de productos de degradación del fibrinógeno/fibrina utilizando un método de aglutinación en látex 374
- Pruebas de detección de monómeros de fibrina 374
- Detección de dímeros-D de fibrina entrecruzados utilizando un método de aglutinación en látex 375

Estudio de portadores de un déficit o defecto congénito de la coagulación 375
- Estudios familiares 375

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

COMPONENTES DE LA HEMOSTASIA NORMAL

Los mecanismos de la hemostasia cumplen diversas funciones de gran importancia: *a)* mantener la sangre fluida mientras sigue circulando dentro del sistema vascular; *b)* detener el sangrado en los sitios de lesión o la pérdida sanguínea mediante un tapón hemostático, y *c)* asegurar la eliminación final del tapón cuando la curación se ha completado. La fisiología normal se basa en un delicado equilibrio entre estas tendencias contrapuestas, y un déficit o exageración de cualquiera de ellas puede contribuir a la trombosis o a la hemorragia. Cinco al menos son los componentes implicados: vasos sanguíneos, plaquetas, factores de la coagulación plasmáticos, sus inhibidores y el sistema fibrinolítico. En este capítulo se presenta una breve revisión de la hemostasia normal, seguida de una discusión de los principios generales de las pruebas básicas utilizadas para investigar la hemostasia y los trastornos hemorrágicos.

El vaso sanguíneo

Estructura general del vaso sanguíneo

La pared del vaso sanguíneo tiene tres capas: íntima, media y adventicia. La íntima consta del endotelio y del tejido conectivo subendotelial y está separada de la media por la lámina elástica interna. Las células endoteliales forman una monocapa continua que delimita todos los vasos sanguíneos. La estructura y función de las células endoteliales varían de acuerdo con su localización dentro del árbol vascular, pero en estado estacionario comparten tres características importantes: son «no trombogénicas» (es decir, promueven el mantenimiento de la sangre en su estado fluido), desempeñan un papel activo en el suministro de nutrientes a las estructuras subendoteliales, y actúan como barrera para las macromoléculas y las partículas de sustancias circulantes en el torrente sanguíneo. La permeabilidad del endotelio puede variar bajo diferentes condiciones para permitir el paso de determinadas moléculas y células.

Función de las células endoteliales[1]

La superficie luminal de la célula endotelial está cubierta por el glucocálix, que consiste en una capa de proteoglucanos. Contiene heparán sulfato y otros glucosaminoglucanos, los cuales son capaces de activar la antitrombina, un importante inhibidor de los factores de la coagulación. El inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) está presente en la superficie de las células endoteliales unido a estos heparanes, pero también se une a un anclaje de GPI (glucofosfoinositol). La importancia relativa de estas dos fuentes de actividad TFPI no es conocida. Las células endoteliales expresan un número de proteínas de la coagulación activas que desempeñan un papel regulador importante, como es el caso de la trombomodulina y el receptor de la proteína C (PC) endotelial. La trombina generada en el lugar de la lesión se une rápidamente a un producto específico de la célula endotelial: la trombomodulina. Una vez unida a esta proteína, la trombina puede activar la PC (que degrada los factores Va y VIIIa) y una carboxipeptidasa (que inhibe la fibrinólisis; se discute más adelante). La trombina también estimula la célula endotelial para producir activador del plasminógeno. El endotelio puede también sintetizar proteína S, es decir, el cofactor para la PC. Finalmente, el endotelio produce factor Von Willebrand (FVW), esencial para la adhesión plaquetaria al subendotelio. Este factor se acumula tanto en gránulos específicos llamados cuerpos de Weibel Palade como es secretado de forma constitutiva, parcialmente hacia la circulación y parcialmente hacia el subendotelio. La expresión de éstas y otras moléculas importantes como las moléculas de adhesión y sus receptores es modulada por citocinas inflamatorias. La membrana formada por la bicapa lipídica también contiene ADPasa (adenosina difosfatasa), una enzima que degrada el ADP (adenosina difosfato), que es un potente agonista plaquetario (v. pág. 369). Muchas de las proteínas de superficie se encuentran localizadas en invaginaciones de la plataforma lipídica que se denominan caveolas[2].

La célula endotelial participa en la vasorregulación mediante la producción y metabolización de numerosas sustancias vasoactivas. Por un lado, metaboliza e inactiva péptidos vasoactivos como la bradicinina y, por otro, puede generar angiotensina II, un vasoconstrictor local, a partir de la angiotensina I circulante. Bajo una estimulación adecuada la célula endotelial puede producir vasodilatadores como el óxido nítrico (ON) y la prostaciclina, o vasoconstrictores como la endotelina y el tromboxano. Estas sustancias tienen su principal efecto vasorregulador a través del músculo liso, pero también ejercen un cierto efecto sobre las plaquetas.

El subendotelio consta de tejido conectivo compuesto de colágeno (principalmente tipos I, III y VI), tejido elástico, proteoglicanos y glucoproteínas no colágenas, incluyendo fibronectina y FVW. Después de producirse el daño en el vaso, estos componentes quedan expuestos a la luz y son responsables de la adherencia plaquetaria. Esto parece ser mediado por la unión del FVW al colágeno, especialmente bajo una alta velocidad de flujo, y también a las microfibrillas, que presentan una afinidad superior por el FVW en determinadas condiciones. El FVW sufre después un cambio conformacional, y las plaquetas son capturadas a través de la glucoproteína Ib de la membrana de superficie unida al FVW. A continuación se produce la activación plaquetaria, y un cambio conformacional en la glucoproteína IIbIIIa permite una ulterior unión, más segura, al FVW a través de su receptor, así como al fibrinógeno. A bajas velocidades de flujo parece dominar[3] la unión directa de las plaquetas al colágeno.

Vasoconstricción[1,4]

Los vasos con capas musculares se contraen tras la lesión, contribuyendo de esa forma a detener la pérdida de sangre. Aunque no todas las reacciones de coagulación son favorecidas por un flujo reducido, probablemente esto ayuda a la formación de un tapón de fibrina estable. La vasoconstricción también tiene lugar en la microcircula-

ción de vasos sin células musculares lisas. Las células endoteliales pueden producir por sí mismas vasoconstrictores como la angiotensina II. Además, las plaquetas activadas producen tromboxano A_2 (TXA_2), que es un potente vasoconstrictor.

Plaquetas[5,6]

Las plaquetas son pequeños fragmentos de citoplasma derivados de los megacariocitos. Miden entre 1,5 y 3,5 μm de diámetro como media pero pueden ser más grandes en algunos estados patológicos. No contienen núcleo y están rodeadas por una membrana bicapa lipídica típica. Junto a la membrana externa yace la banda marginal de microtúbulos, que mantiene la forma de la plaqueta y se despolimeriza cuando la agregación comienza. El citoplasma central está poblado de tres tipos de gránulos plaquetarios: los gránulos δ, α y lisosomales. Los contenidos de estos diversos gránulos se detallan en la tabla 16.1. Finalmente, existe el sistema tubular denso y el sistema canalicular de membrana, que se comunica con el exterior. No queda claro cómo todos estos elementos actúan conjuntamente para realizar funciones como la contracción y la secreción, que son características de la activación plaquetaria.

La membrana de la plaqueta es el sitio de interacción entre el ambiente plasmático y la pared del vaso dañado. Consta de colesterol, fosfolípidos, glucolípidos y al menos nueve glucoproteínas, designadas GpI-GpIX. Los fosfolípidos de membrana presentan una distribución asimétrica, predominando la esfingomielina y la fosfatidilcolina en la capa externa, y la fosfatidil etanolamina, el fosfatidil inositol y la fosfatidil serina en la capa interna. Después de la activación plaquetaria la membrana también expresa sitios de unión para las proteínas de coagulación como el factor XI y el factor VIII.

El sistema contráctil de la plaqueta comprende el sistema microtubular denso y los microfilamentos circunferenciales, que mantienen la forma de disco. La actina es el principal constituyente del sistema contráctil, pero la miosina y una proteína de unión al calcio, la calmodulina, también están presentes.

Función plaquetaria en el proceso hemostático[7]

Los principales pasos en la función plaquetaria son los de adhesión, activación con cambio de forma y agregación. Cuando la pared vascular ha sido dañada, las estructuras subendoteliales, incluida la membrana basal, el colágeno y las microfibrillas, quedan expuestas. El FVW unido a la superficie se liga a la GpIb de las plaquetas circulantes, lo que conduce a que se produzca una monocapa inicial de plaquetas adheridas. La unión a través de la GpIb inicia la activación de la plaqueta a través de un mecanismo de proteínas G. Una vez activadas, las plaquetas cambian inmediatamente de forma y dejan de constituir un disco para convertirse en una diminuta esfera con la proyección de numerosos seudópodos. Después de la adhesión de una única capa de plaquetas al subendotelio expuesto, las plaquetas se unen entre sí para formar agregados. El fibrinógeno, la fibronectina y los complejos de glucoproteína Ib-IX y IIbIIIa son esenciales en este estadio para incrementar el contacto célula a célula y facilitar la agregación. Ciertas sustancias (agonistas) reaccionan con receptores plaquetarios específicos de membrana para promover la agregación plaquetaria y la posterior activación. Los agonistas incluyen fibras de colágeno expuestas, ADP, trombina, adrenalina, serotonina y ciertos metabolitos del ácido araquidónico incluyendo el TXA_2. En áreas de flujo sanguíneo no lineal, como puede ocurrir en el lugar de una lesión, los hematíes localmente dañados liberan ADP, lo que posteriormente activa las plaquetas.

Tabla 16.1. Algunos contenidos de gránulos plaquetarios

Gránulos densos (δ)	Gránulos α	Vesículas lisosomales
ATP	PF4	Galactosidasas
ADP	β-Tromboglobulina	Fucosidasas
Calcio	Fibrinógeno	Hexosaminidasa
Serotonina	Factor V	Glucuronidasa
Pirofosfato	Trombospondina	Catepsina
P selectina (CD62)	Fibronectina	Glucohidrolasas
Factor transformador de crecimiento-beta (1)	PDGF	+ otros
Catecolaminas (noradrenalina/adrenalina)	PAI-1	
GDP/GTP	Glucoproteína rica en histidina α_2 Macroglobulina Inhibidor de plasmina P selectina (CD62)	

ADP, adenosina 5'-difosfato; ATP, adenosina 5'-trifosfato; GDP, guanosina 5'-difosfato; GTP, guanosina 5'-trifosfato; PAI-1, inhibidor del activador de plasminógeno-1; PDGF, factor de crecimiento derivado de las plaquetas.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Agregación plaquetaria

La agregación plaquetaria puede ocurrir por al menos dos vías independientes pero íntimamente ligadas. La primera vía incluye el metabolismo del ácido araquidónico. La activación de la enzima fosfolipasa (PLA_2) libera ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana (fosfatidilcolina). Aproximadamente el 50% del ácido araquidónico libre es convertido por la enzima lipooxigenasa en una serie de productos entre los que se incluyen los leucotrienos, que son importantes agentes quimiotácticos para los leucocitos. El 50% del ácido araquidónico restante es convertido por la enzima ciclooxigenasa en endoperóxidos cíclicos lábiles, la mayoría de los cuales son a su vez convertidos por la tromboxano sintetasa en TXA_2. El TXA_2 tiene intensos efectos biológicos, causa la liberación secundaria de gránulos plaquetarios y vasoconstricción local, así como una posterior agregación plaquetaria local mediante la segunda vía descrita más abajo. Ejerce estos efectos elevando la concentración de calcio libre intracelular citoplasmático y la unión a receptores granulares específicos. El TXA_2 es muy lábil; tiene una semivida menor de 1 min antes de degradarse en el inactivo tromboxano B_2 (TXB_2) y malonildialdehído.

La segunda vía de activación y agregación puede darse de forma completamente independiente con respecto a la primera: varios agonistas plaquetarios, incluidos la trombina, el TXA_2 y el colágeno, se unen a receptores y, a través de un mecanismo mediado por proteína G, activan la fosfolipasa C. Esto genera diacilglicerol e inositol trifosfato, lo que a su vez activa la proteincinasa C y eleva el calcio intracelular, respectivamente. El calcio es liberado desde el sistema tubular denso para formar complejos con calmodulina. Este complejo y el calcio libre actúan como coenzimas en la reacción de liberación, en la activación de diferentes proteínas reguladoras, de actina y miosina y del sistema contráctil, y también en la liberación de ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana y la generación de TXA_2.

Las plaquetas forman primero agregados reversibles y poco cohesionados, pero después de la reacción de liberación de los gránulos plaquetarios se forma un agregado más firme y extenso. Los cambios en la configuración de la membrana plaquetaria tienen lugar en ese momento; un reordenamiento «de vaivén» de la superficie trae la fosfatidil serina y el fosfatidil inositol cargados negativamente a la capa externa, generando así actividad (procoagulante) del factor plaquetario 3. Al mismo tiempo, se exponen en la superficie plaquetaria receptores específicos para diversos factores de coagulación y ayudan a coordinar el ensamblado de los complejos enzimáticos del sistema de coagulación. La generación local de trombina activará en adelante las plaquetas.

Las plaquetas no se activan si están en contacto con células endoteliales sanas. La «no trombogenicidad» del endotelio es resultado de una combinación de los mecanismos de control ejercidos por las células endoteliales: síntesis de prostaciclina, capacidad para unirse a la trombina y activar el sistema PC, capacidad para inactivar sustancias vasoactivas y otras diversas. La prostaciclina liberada localmente se une a receptores específicos de membrana plaquetaria y a continuación activa la adenilato ciclasa unida a la membrana (produciendo adenosina monofosfato cíclico o AMPc). El AMPc inhibe la agregación plaquetaria inhibiendo el metabolismo del ácido araquidónico y la liberación de los iones de calcio citoplasmático libre.

Por tanto, las plaquetas tienen al menos tres papeles en la hemostasia:

1. Adhesión y agregación formando el tapón hemostático primario.
2. Liberación de moléculas activadoras y procoagulantes.
3. Exposición de una superficie procoagulante para las reacciones de los sistemas de coagulación.

Coagulación sanguínea[8]

El acontecimiento central en las vías de la coagulación es la producción de trombina, que actúa sobre el fibrinógeno para producir fibrina y, por tanto, el coágulo de fibrina. Este coágulo es posteriormente fortalecido por la acción de entrecruzamiento que ejerce el factor XIII, que asimismo es activado por la trombina. Las dos pruebas de coagulación más utilizadas, es decir, el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA) y el tiempo de protrombina (TP), se han aplicado tradicionalmente para definir las dos vías de la activación de la coagulación: las vías intrínseca y extrínseca, respectivamente. Sin embargo, esto guarda sólo una relación limitada con la forma en que la coagulación se activa *in vivo*. Por ejemplo, los déficits de factor XII o de factor VIII producen en ambos casos marcadas prolongaciones del TTPA, pero sólo el déficit de la última se asocia con una tendencia hemorrágica. Además, hay considerable evidencia de que la activación del factor IX (vía intrínseca) por el factor VIIa (vía extrínseca) es crucial para establecer la coagulación después de que el estímulo inicial haya sido proporcionado por la activación de factor VIIa-factor tisular (FT) del factor X[8]. Véase la figura 16.1.

La investigación del sistema de coagulación se centra en los factores de coagulación, pero la actividad de estas proteínas también depende en gran medida de los receptores de superficie específicos y de los fosfolípidos, fundamentalmente presentados en la superficie de las plaquetas pero también del endotelio activado. La necesidad de la presencia de calcio en muchas de estas reacciones se utiliza para controlar su actividad *in vitro*. Los diversos factores de la coagulación se describen en las siguientes secciones, hasta donde es posible dentro de grupos funcionales. Sus propiedades se detallan en la tabla 16.2.

Sistema de activación de contacto[9]

El sistema de activación de contacto comprende el factor XII (factor de Hageman), el cininógeno de alto peso molecular (HMWK) (factor de Fitzgerald) y la precalicreína/calicreína (factor de Fletcher). Como se mencionó previamente, estos factores no parecen ser esenciales en la he-

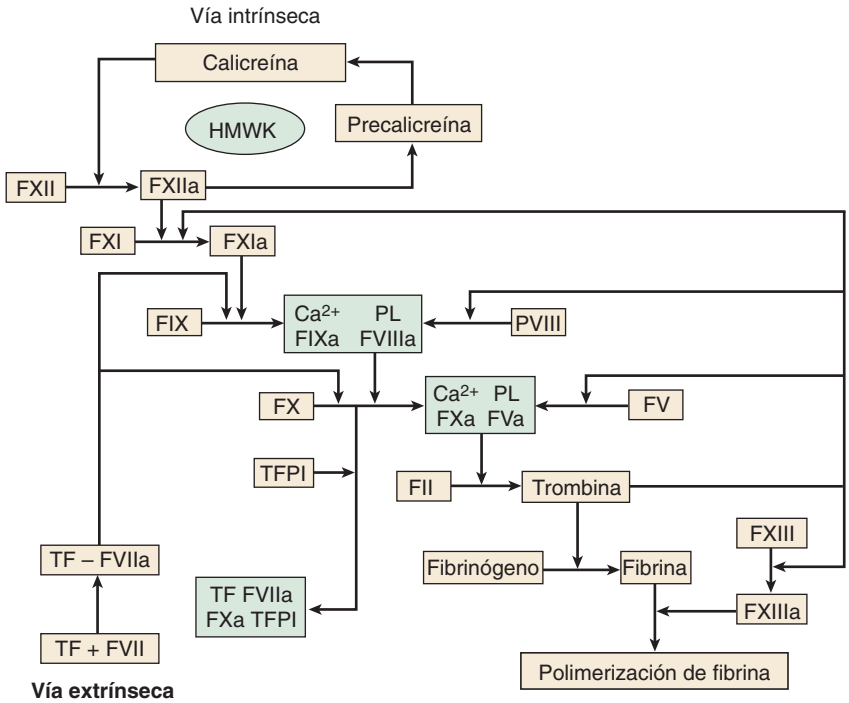


Figura 16.1. Representación esquemática de la red de coagulación. Las interacciones principales se muestran por las flechas en negrita. No se muestran los factores inhibidores ni los mecanismos de limitación de la coagulación. FL, fosfolípido; HMWK, cininógeno de alto peso molecular; TFPI, inhibidor de la vía del factor tisular.

mostasia *in vivo*. Hay pruebas de que su capacidad para activar el sistema fibrinolítico puede ser funcionalmente más importante que su capacidad para generar péptidos vasoactivos. En concreto, la bradicinina es liberada del HMWK por la precalicreína o la disociación del FXIIa. La calicreína y el factor XIIa también funcionan como agentes quimiotácticos para neutrófilos.

Cuando se unen a superficies cargadas negativamente *in vitro*, el factor XII y la precalicreína son capaces de activarse recíprocamente entre sí mediante una proteólisis limitada, pero el acontecimiento inicial no está claro. Podría ser que un cambio conformacional en el factor XII afecte a su capacidad de fijación, lo que resultaría en una autoactivación limitada que dispararía el proceso. El HMWK actúa como un cofactor (dependiente de cinc) facilitando el anclado de la precalicreína y del factor XI, con los que circula en forma de complejo, a la superficie negativamente cargada. Se ha demostrado en los estudios *in vitro* que las plaquetas o las células endoteliales pueden proporcionar la superficie cargada negativamente necesaria para este mecanismo y que también poseen receptores específicos para el factor XI. El sistema de contacto puede activar la fibrinólisis mediante cierto número de mecanismos: disociación del plasminógeno, activación del activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPA), y la liberación del activador tisular del plasminógeno (tPA). Lo que es más importante desde el punto de vista del laboratorio, el sistema de activación por contacto conduce a la generación de factor XIIa, que es capaz de activar el factor XI, iniciando así la cascada de la coagulación a partir de la vía intrínseca.

Factor tisular

El FT es el cofactor de la vía extrínseca y el iniciador fisiológico de la coagulación. Se trata de una lipoproteína que está ligada a la membrana y aparece de forma constitutiva en muchos tejidos además del árbol vascular, así como en la superficie de las células estimuladas por la inflamación como los monocitos y, bajo determinadas condiciones, las células endoteliales. El factor VIIa se une al FT en presencia de iones de calcio y después se vuelve enzimáticamente activo. Pequeñas cantidades de factor VIIa están presentes en la circulación pero virtualmente carecen de actividad enzimática a menos que se unan al FT. El complejo factor VIIa-FT puede activar tanto el factor X como el factor IX, y por tanto se estimulan dos rutas que conducen a la producción de trombina. El factor Xa subsiguientemente se une al TFPI y después al factor VIIa para formar un complejo cuaternario (Xa-FT-VIIa-TFPI). Este mecanismo por tanto funciona como interruptor de la vía extrínseca después de que se haya producido un estímulo inicial de la coagulación.

Factores dependientes de la vitamina K

El grupo de los factores dependientes de la vitamina K incluye los factores de la coagulación II, VII, IX y X. Sin em-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 16.2. Factores de la coagulación

N.º	Factor	MMR (Daltons)	Semivida	Concentración en plasma	
				µg/ml	nmol/l
I	Fibrinógeno	340.000	90 h	1,5-4 × 10	–
II	Protrombina	70.000	60 h	100-150	1.400
V	–	330.000	12-36 h	5-10	20
VII	–	48.000	6 h	0,5	10
VIII	–	200.000	12 h	0,2	0,7
FVW	–	800.000-140.000.000	24 h	10	–
IX	–	57.000	24 h	4	90
X	–	58.000	40 h	10	170
XI	–	158.000	60 h	6	30
XII	–	80.000	48-52 h	30	375
Precalicreína	–	85.000	48 h	40	450
HMWK	–	120.000	6,5 días	80	700
XIII	–	32.000	3-5 días	30 (A+B)	900 (tetrámero)

FVW, factor de Von Willebrand; HMWK, cininógeno de alto peso molecular; MMR, masa molecular relativa (peso molecular).

bargo, es importante recordar que las proteínas anticoagulantes S, C y Z también son dependientes de la vitamina K. Cada una de estas proteínas contiene un determinado número de residuos de ácido glutámico en su extremo amino terminal que son γ carboxilados por un mecanismo dependiente de la vitamina K. Esto da lugar a un nuevo aminoácido, el ácido γ-carboxiglutámico, que es importante para promover un cambio conformacional en la proteína que promueve la unión del factor al fosfolípido. Debido a que esta unión es crucial para coordinar la interacción de diversos factores, las proteínas producidas en ausencia de vitamina K (PIVKA) que no son γ carboxiladas carecen de función significativa. Los factores dependientes de la vitamina K son proenzimas o zimógenos, que requieren la disociación algunas veces con liberación de un pequeño péptido (péptido de activación) para hacerse funcionales. La medición de estos péptidos de activación ha sido utilizada como forma de evaluar la activación de la coagulación.

Cofactores

Los factores VIII y V son los dos más lábiles entre todos los factores de coagulación, y se pierden rápidamente en la sangre almacenada o el plasma calentado. Comparten un considerable parecido estructural y son cofactores para las serin proteasas FIX y FX, respectivamente. Ambos requieren la activación proteolítica del factor IIa o Xa para funcionar. El factor VIII circula en combinación con el FVW, que se encuentra en forma de grandes multímeros constituidos a partir de un monómero de 200 kD. Una función del FVW es estabilizar el factor VIII y protegerlo de la degradación. En ausencia del FVW, la supervivencia del factor VIII en la circulación es extremadamente corta (esto es, <2 h en vez de las 8-12 h normales). El FVW puede también servir para conducir el factor VIII a las plaquetas adheridas a un lugar donde ha tenido lugar una lesión vascular. Una vez que el factor VIII ha sido disociado y activado por la trombina, ya no vuelve a unirse al FVW.

Fibrinógeno[10,11]

El fibrinógeno es una proteína dimérica de gran tamaño: cada mitad consta de tres polipéptidos denominados Aα, Bβ y γ que están unidos entre sí por 12 puentes disulfuro. Los dos monómeros están unidos por otros tres puentes disulfuro. Una variante de cadena γ denominada γ′ es producida por la variación en el procesamiento del ARN mensajero. En el proceso se pierde un lugar de unión de la plaqueta y aparecen sitios de unión de alta afinidad para el FXIII y la trombina. La variante γ′ constituye aproximadamente el 10% del fibrinógeno plasmático. Una cadena variante menos frecuente (<2%) «γE» es también producida por una variación en el procesamiento génico. El fibrinógeno también se encuentra en las plaquetas, pero la mayor cantidad de éste deriva de la endocitosis de fibrinógeno plasmático mediada por la glucoproteína IIbIIIa, que a continuación es acumulado en gránulos α, en vez de ser realmente sintetizado en los megacariocitos. La fibrina se forma a partir del fibrinógeno mediante la disociación que realiza la trombina de los péptidos A y B del fibrinógeno. Esto produce monómeros de fibrina que se asocian para formar un polímero que es el coágulo visible. El dominio E central expuesto por la disociación de la trombina se une con una región complementaria de la parte externa o do-

minio D de otro monómero. Los monómeros de esta forma se ensamblan en una fibrilla de doble cadena escalonada y solapada. Interacciones más complejas conducen subsiguientemente a la formación de una fibra más gruesa y ramificada.

Factor XIII

El coágulo de fibrina inicial se mantiene unido por interacciones no covalentes y puede deformarse y volver a hacerse soluble. El factor XIII, que es también activado por la trombina, es capaz de establecer puentes covalentes entre esos monómeros de fibrina. El factor XIII es una transglutamina que une un residuo de glutamina de una cadena con una lisina de una cadena adyacente. Esta pérdida de solubilidad es la base de la prueba de detección del déficit de factor XIII.

Inhibidores de la coagulación[12,13]

Cierto número de mecanismos existentes aseguran que la producción del coágulo de fibrina se vea limitada al sitio de la lesión y que no se permita su propagación indefinida. En primer lugar, hay un determinado número de proteínas que se unen e inactivan las enzimas de la cascada de la coagulación. Probablemente el primero de éstos en hacerse activo es el TFPI, lo que rápidamente enfría el complejo de factores VIIa-FT que inicia la coagulación. Esto se logra mediante la combinación en primer lugar con el factor Xa de forma que la coagulación es por tanto dependiente de la pequeña cantidad de trombina que ha sido generada activando la vía intrínseca.

El principal inactivador fisiológico de la trombina es la antitrombina (AT; anteriormente ATIII) que pertenece al grupo de proteínas de la serpina. Ésta se une al factor IIa formando un complejo inactivo trombina-antitrombina (TAT), que a continuación es eliminado de la circulación por el hígado. Este proceso es potenciado en gran medida por la presencia de heparina o del heparán de la pared de los vasos. La AT es responsable de aproximadamente el 60% de la capacidad de inactivación de la trombina en el plasma, y el resto de dicha capacidad de inactivación se debe al cofactor II de la heparina y a inhibidores menos específicos como la macroglobulina $\alpha 2$. La AT es también capaz de inactivar los factores X, IX, XI y XII pero en menores grados que la trombina.

Conforme la trombina se dispersa a partir del área de la lesión, se une también a la trombomodulina presente en la superficie de las células endoteliales. De esta forma pasa de ser fundamentalmente una proteína procoagulante a convertirse en una proteína anticoagulante. Aunque aún sigue siendo factible su unión a la AT, la trombina unida a la trombomodulina deja de disociar el fibrinógeno. A partir de ese momento tiene una preferencia marcada por la PC como sustrato. La PC activada por la disociación de la trombina actúa limitando y deteniendo la coagulación al inactivar los factores Va y VIIIa. Esta acción es en adelante potenciada por su cofactor, la proteína S, que no requiere activación previa. En vasos más grandes, donde la concentración efectiva de trombomodulina es baja, la unión de PC es potenciada por el receptor endotelial de PC (REPC). La PC es subsiguientemente inactivada por su propio inhibidor específico.

Sistema fibrinolítico

El depósito de fibrina y su eliminación son procesos regulados por el sistema fibrinolítico[14]. Aunque éste es un complejo sistema multicomponente con muchos activadores e inhibidores, se organiza en torno a la actividad enzimática de la plasmina para producir la disociación del fibrinógeno y de la fibrina. La plasmina circula en forma de su precursor inactivo, el plasminógeno, que es activado por disociación proteolítica. El principal activador del plasminógeno (AP) en seres humanos es el activador tisular del plasminógeno (tPA) que es otra serina proteasa. Tanto el tPA como el plasminógeno son capaces de unirse a la fibrina a través del aminoácido lisina. Cuando están juntos los dos, la tasa de activación del plasminógeno está marcadamente incrementada, y por tanto la plasmina se genera predominantemente en el sitio de acción y no de forma libre en el plasma. El segundo AP fisiológico en importancia en humanos se denomina tipo urocinasa (uPA). Esta molécula de cadena única (scu-PA) es activada por la plasmina o la calicreína mediante su conversión en un derivado de dos cadenas (tcu-PA), que no ejerce una acción fibrinoespecífica. Sin embargo, la importancia *in vivo* de esto no es clara, y la identificación de los receptores de superficie celular para la uPA sugiere que su papel primario puede ser extravascular. El sistema de activación de contacto también parece generar alguna activación del plasminógeno a través del factor XIIa, y la bradicinina estimula la liberación del tPA. Los productos de degradación liberados como consecuencia de la acción de la plasmina sobre la fibrina son de utilidad diagnóstica y se discuten más adelante en este capítulo. La activación de la fibrina por la plasmina viene limitada por la acción de una carboxipeptidasa, que elimina los residuos lisina del extremo amino terminal necesarios para la unión de plasminógeno y tPA. Esta carboxipeptidasa es activada por la unión de trombina y trombomodulina y es denominada inhibidor de la fibrinólisis activado por la trombina (TAFI).

El PAI-1 (inhibidor del activador del plasminógeno-1) es un potente inhibidor del tPA, producido por las células endoteliales, los hepatocitos, las plaquetas y la placenta. Los niveles en plasma son altamente variables. Es un miembro de la familia de las serpinas y es activo contra el tPA y el tcu-PA pero contra el scu-PA. Se ha identificado también un segundo inhibidor PAI-2, originariamente a partir de la placenta humana, pero su papel e importancia no han sido todavía establecidos.

El principal inhibidor fisiológico de la plasmina en el plasma es el inhibidor de plasmina ($\alpha 2$-antiplasmina) que inhibe la función de la plasmina formando un complejo 1:1 (complejo plasmina-antiplasmina, PAP). Esta reacción en solución libre es extremadamente rápida pero depende de la disponibilidad de sitios de unión de lisina

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

para la plasmina. De esta forma, la plasmina unida a la fibrina en el coágulo no es accesible al inhibidor. Los déficits del sistema fibrinolítico son raros pero se han asociado algunas veces con una tendencia a la trombosis o a la hemorragia.

APROXIMACIÓN GENERAL A LA INVESTIGACIÓN DE LA HEMOSTASIA

Esta sección empieza con algunos puntos generales acerca del enfoque clínico y de laboratorio en la investigación de la hemostasia. Después de esto, se describen las pruebas básicas o de primera línea de cribado de la hemostasia. Estas pruebas generalmente se utilizan como el primer paso en la investigación de un paciente con hemorragia aguda, en sujetos con una sospecha de tendencia a la hemorragia o como precaución antes de llevarse a cabo un procedimiento invasivo. Tienen la virtud de que son fácilmente llevadas a cabo y los patrones de alteraciones obtenidos apuntan claramente al siguiente grupo de estudios que se deben realizar. Debe recordarse, sin embargo, que estas pruebas pueden ser normales en presencia de una diátesis hemorrágica leve aunque significativa, como es el caso de la enfermedad de Von Willebrand (EVW) o en trastornos plaquetarios o de los vasos. De aquí que un cribado de coagulación normal no deba considerarse equivalente a que la hemostasia sea normal.

Aproximación clínica

La investigación de una sospecha de diátesis hemorrágica puede empezar desde tres puntos diferentes:

1. *Investigación de una diátesis hemorrágica que se sospecha clínicamente*. La investigación propiamente dicha empieza con una historia de sangrados, que puede sugerir un trastorno congénito o adquirido de la hemostasia primaria o secundaria. Si los antecedentes personales o familiares de hemorragias son significativos, deben realizarse pruebas y ensayos específicos adecuados, sean cuales sean los resultados de las pruebas de cribado como el TP, el TTPA y otros.
2. *Seguimiento de una prueba de primera línea con resultado anormal*. Las anormalidades ya detectadas determinarán las investigaciones posteriores más adecuadas (se discuten más adelante).
3. *Investigación de un fracaso agudo de la hemostasia*. Ésta suele requerirse en el contexto de un paciente agudamente enfermo o en el postoperatorio. Las investigaciones por tanto se dirigen a detectar una coagulación intravascular diseminada (CID) o un defecto de coagulación previamente no detectado (congénito o adquirido). La disponibilidad de una prueba de coagulación de cribado normal premórbida y la realización de una posterior anamnesis para determinar la historia de hemorragias puede ser extremadamente útil a este respecto.

En todos los casos, la evaluación clínica minuciosa, incluyendo la historia personal, la historia familiar, la realización del árbol familiar, así como los detalles sobre la localización, la frecuencia y el carácter de las manifestaciones hemorrágicas (púrpura, tendencia a sufrir hematomas, hematomas grandes, hemartrosis, etc.), es siempre un requisito para establecer un diagnóstico definitivo. Si se consideran en conjunto con los resultados de laboratorio, ayudarán a evitar una interpretación incorrecta de los resultados. Es también deseable llevar a cabo una serie de pruebas de cribado antes de proceder a pruebas más específicas. Los resultados de las investigaciones de cribado, tomados en conjunto con la información clínica, habitualmente apuntan al procedimiento adicional adecuado.

A pesar de su simplicidad, es claramente importante que los resultados obtenidos de las pruebas de primera línea sean reproducibles y precisos. Esto requiere prestar atención a la recogida de las muestras sanguíneas y al procesamiento, selección, preparación y almacenamiento de los reactivos, así como al uso de controles y estándares adecuados. Los laboratorios deben participar en los esquemas de evaluación de calidad locales o nacionales.

Fundamento de los análisis de laboratorio

Es importante recordar que las pruebas de coagulación realizadas en laboratorio son intentos de mimetizar *in vitro* procesos que normalmente ocurren *in vivo*. No debe sorprender que esto pueda dar lugar a resultados erróneos. Uno de los más impactantes es la prolongación grosera del TTPA en el déficit completo de factor XII en ausencia de cualquier diátesis hemorrágica. De forma análoga, la cantidad de factor VII requerida para producir un TP normal es mucho mayor que la cantidad requerida para una hemostasia normal *in vivo*. En contraposición, unas pruebas de cribado normales no implican necesariamente que el paciente tenga una hemostasia normal. La única prueba de coagulación *in vivo* que se lleva a cabo con cierta frecuencia es el tiempo de sangría, e incluso con esta prueba hay notables discrepancias entre los resultados y la propensión clínica al sangrado.

Las investigaciones más detalladas sobre las proteínas de la coagulación también requieren una interpretación cauta dependiendo del tipo de ensayo realizado. Éstos pueden dividirse en tres categorías principales, como se describe en las secciones siguientes.

Análisis inmunológicos

Las pruebas inmunológicas incluyen la inmunodifusión, la inmunoelectroforesis, los ensayos radioinmunométricos, las pruebas de aglutinación en látex y las pruebas que utilizan ensayos de inmunoabsorción enzimática (ELISA). Fundamentalmente, todas estas pruebas se apoyan en el reconocimiento de la proteína en cuestión mediante anticuerpos monoclonales o policlonales. Los anticuerpos policlonales carecen de especificidad pero proporcionan una

sensibilidad relativamente alta, mientras que los anticuerpos monoclonales son altamente específicos pero se unen de forma relativamente débil a los antígenos. Los ensayos inmunológicos suelen ser fáciles de realizar, especialmente cómodos para ser practicados en grandes series, y pueden comprarse como equipos con controles estandarizados. El inconveniente obvio de estos ensayos es que pueden no decir nada acerca de la capacidad funcional del antígeno detectado. Si es posible, deben llevarse a cabo en paralelo con un ensayo funcional.

Con los avances en la automatización, los equipos de aglutinación en látex se están haciendo más populares y van reemplazando a los ensayos de ELISA más establecidos. Las micropartículas de látex se revisten con anticuerpos específicos con el objeto de determinar la presencia de antígenos. Cuando la suspensión de látex se mezcla con plasma tiene lugar una reacción antígeno-anticuerpo, que conduce a la aglutinación de las micropartículas de látex. La aglutinación conduce a un incremento de la turbidez del medio de reacción, y este incremento en la turbidez se mide fotométricamente como un incremento de la absorbancia. Habitualmente, la longitud de onda utilizada en los análisis con látex es de 405 nm, aunque para algunos ensayos se utiliza una longitud de onda de 540 o 800 nm. Las instrucciones específicas de aplicación deben seguirse según las especificaciones de cada equipo. Este tipo de ensayo se denomina inmunoturbidométrico. Las partículas de látex no deben congelarse porque esto conducirá a un aglutinado irreversible. Un problema ocasional con los ensayos de aglutinación en látex es la interferencia producida por el factor reumatoide o por las paraproteínas. Éstas pueden causar aglutinación y una sobreestimación de la proteína que se desea estudiar. En dichos casos es preferible recurrir a un ensayo mediante ELISA. Las aplicaciones de las partículas de látex son las siguientes:

- Estándares de calibración.
- Pruebas de filtros.
- Ensayos de aglutinación.
- Estudios de fagocitosis.
- Estándares de citometría de flujo.
- Velocímetro láser Doppler.
- Estudios de difusión lumínica.

Ensayos en que se utilizan sustratos peptídicos cromogénicos (ensayos amidolíticos)

Las serin proteasas de la cascada de la coagulación tienen estrechas especificidades de sustrato. Es posible sintetizar un péptido corto específico para cada enzima con un cromógeno (*p*-nitroanilina, *p*-NA) ligado al aminoácido terminal. Cuando el péptido sintético reacciona con la enzima específica, el cromógeno se libera y su tasa de liberación o la cantidad total liberada se puede medir fotométricamente. Esto da una medida de la actividad enzimática presente. Los ensayos con sustratos cromogénicos pueden clasificarse en ensayos directos e indirectos. Los ensayos directos pueden subclasificarse aún más en ensayos primarios, en los que se utiliza un sustrato específico para la enzima que va a ser medida, y los ensayos secundarios, en los que la enzima o proenzima medidas se utilizan para activar una segunda proteasa para la cual se dispone de un sustrato específico. Se dispone de sustratos específicos para muchas enzimas de la coagulación. Sin embargo, la especificidad de sustrato no es absoluta y la mayoría de los equipos incluyen inhibidores de otras enzimas capaces de disociar el sustrato a fin de mejorar la especificidad. Los ensayos indirectos se utilizan para medir los inhibidores que aparecen de forma natural y para algunos factores plaquetarios[15].

Debe recordarse que la medición de la actividad amidolítica no es la misma que la medición de la actividad biológica en un ensayo de coagulación y en algunos casos puede no reflejar de forma precisa aquélla. Esto es especialmente importante cuando se trata de analizar las variantes moleculares de varios factores de coagulación. Sin embargo, el continuo desarrollo de sustratos más específicos con buena solubilidad y alta afinidad por enzimas concretas, junto con los rápidos avances en la automatización, han convertido las enzimas con sustratos cromogénicos en crecientemente populares. Los ensayos pueden llevarse a cabo en una placa de microtitulación o en un tubo cuando se puede utilizar un espectrofotómetro para medir la intensidad del color desarrollado.

Ensayos de coagulación

Los ensayos de coagulación son bioensayos funcionales y se sustentan en la comparación de una preparación control o estándar con un nivel conocido de actividad. En un sistema en un tiempo deben existir cantidades óptimas de todos los factores de coagulación excepto de aquel que va a ser determinado, el cual debería estar tan cerca de cero como sea posible. El mejor sistema en un tiempo es el proporcionado por un plasma sustrato obtenido, o bien de un paciente con un déficit congénito grave, o bien deplecionado artificialmente mediante inmunoadsorción. Los principios del bioensayo, su estandarización y sus limitaciones se consideran en detalle en la página 350.

Las técnicas de coagulación también se utilizan para aunar pruebas que permitan identificar un factor ausente en caso de urgencia o identificar y estimar cuantitativamente un inhibidor o anticoagulante. La ventaja de este tipo de ensayos es que se aproximan más a la actividad *in vivo* del factor en cuestión. Sin embargo, pueden ser técnicamente más difíciles de realizar que los otros tipos descritos previamente.

Otros análisis

Otros análisis incluyen la medición de los factores de coagulación utilizando venenos de serpientes, el análisis del cofactor de la ristocetina y la prueba de solubilidad del coágulo para el factor XIII. Los análisis de ADN se están haciendo cada vez más útiles y prevalentes en el estudio de la coagulación. Sin embargo, esto requiere equipamientos y técnicas enteramente distintos (v. cap. 21).

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

EQUIPAMIENTO

Baños de agua

Para realizar las pruebas de coagulación manuales es necesario disponer de un baño a 37 °C para las incubaciones y para el descongelado rápido de especímenes. Los baños puestos a 37 °C no deben variar en más de ±0,5 °C porque ligeras variaciones en la temperatura afectarán de forma marcada la velocidad de las reacciones de coagulación. Es preferible un baño con paredes de plástico o cristal, y alguna forma de transiluminación ayudará a determinar el momento exacto y el aspecto de la formación del coágulo de fibrina. Comprobar que la temperatura es 37 °C antes y durante su uso. Para llenar y mantener el nivel de agua se debe utilizar agua destilada.

Neveras y congeladores

Comprobar que la temperatura no ha estado fuera del intervalo aceptado de 4 ± 2 °C en las neveras y −20 ± 2 °C en los congeladores, volviendo a realizar las comprobaciones durante el día. Se deben conservar los registros.

Centrífugas

Realizar las comprobaciones necesarias para asegurar que cada máquina está limpia antes y después de su uso. Hacer también una inspección visual de rotores, cubos y alineadores para detectar corrosión y grietas. Deben conservarse registros detallados.

Reactivos y tampones

Se debe prestar atención a la edad y el estado de las soluciones. Esto es especialmente importante con la solución de cloruro cálcico. Siempre que se prepare una solución, ésta debe ser correctamente etiquetada y fechada. Los tampones deben ser inspeccionados para detectar un posible crecimiento bacteriano antes de utilizarse. La contaminación con microorganismos puede causar errores y fallos en el ensayo como resultado de la liberación de enzimas y otras sustancias biológicas activas en solución. Se puede añadir azida como conservante de algunos tampones, pero no debe utilizarse en reactivos para estudios plaquetarios o en sustratos de ELISA. Los sustratos cromogénicos deben reconstituirse con agua destilada estéril; la contaminación con enzimas bacterianas pueden causar liberación de paranitroanilina (pNA) y una coloración amarillenta del reactivo. Se deben conservar registros de los números de lote y de las fechas de caducidad.

Tubos de plástico y cristal

Para las pruebas de coagulación, se deben emplear tubos de ensayo de cristal sin reborde. Los tubos de plástico deben utilizarse para las diluciones de muestras, almacenamiento y preparación de los reactivos.

Pipetas

Debe disponerse de un grupo de pipetas de cristal graduadas (clase A certificada) y de pipetas automáticas. Estas últimas deben ser adecuadas y duraderas. Los líquidos no se deben arrastrar dentro del cilindro de la pipeta y los ácidos no se deben pipetear con instrumentos que contengan ensambles de pistones metálicos, que puedan dañarse o corroerse. Es vital prestar atención a la técnica porque se puede producir la contaminación de los reactivos con las puntas de las pipetas, puede haber errores de volumen como consecuencia de la existencia de líquido en el exterior de la punta de la pipeta, o la forma de dispensar un reactivo puede alterar los resultados obtenidos. La cantidad de fluido arrastrado dentro de la punta debe inspeccionarse visualmente con cada proceso de pipeteado. Se deben conservar registros de la adecuación y precisión en el funcionamiento de las pipetas.

Cronómetros y relojes

Los cronómetros son útiles para determinar períodos de incubación de varios minutos o más, pero aquellos que deben mantenerse en la mano y ser controlados rápidamente deben utilizarse sólo para medir tiempos de coagulación y durante las incubaciones cortas. A no ser que se utilice un coagulómetro automático son necesarios al menos cuatro cronómetros.

Análisis automatizados de coagulación

Existe una amplia variedad de analizadores de coagulación automatizados y semiautomatizados en el mercado. La selección del analizador depende de la carga de trabajo prevista, del inventario y de implicaciones de coste. Se recomienda una evaluación minuciosa de los analizadores disponibles actualmente. Esta evaluación se ve facilitada por los informes sobre la evaluación de instrumentos, por ejemplo de la National Health Services Medical Devices Agency[a] (v. pág. 540).

Si se utilizan analizadores de coagulación, es importante asegurar que el control de temperatura y el mecanismo para detectar la variable de interés están funcionando de forma apropiada. Aunque tales instrumentos reducen el error del observador cuando se evalúa un amplio número de muestras, es importante aplicar estrictos controles de calidad en todos los momentos para asegurar su exactitud y precisión.

Evaluación y selección de un analizador automático

La adquisición o el *leasing* de nuevo equipamiento es un proceso complicado, y los factores más importantes que se deben considerar varían de un laboratorio a otro.

Los estándares de especificación pueden clasificarse como *obligatorios* o *deseables*.

Requisitos obligatorios:

- Realización de ensayos de coagulación, cromogénicos e inmunológicos.
- Resultados fiables de pruebas con niveles aceptables de exactitud y precisión.
- Vial cerrado, de tapa perforable.
- Identificación positiva mediante código de barras.
- Marcado efectivo de los resultados anormales.

[a] Actualmente, Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency.

- Almacenaje de los datos de control de calidad.
- Estabilidad de reactivos.
- Tiempo adecuado de procesamiento de las muestras según la carga de trabajo.
- Análisis rápido de muestras urgentes.
- Interfase bidireccional.
- Carga continua de muestras.
- Conformidad con la legislación en salud y seguridad nacional.

Requisitos adicionales deseables:

- Buenas referencias del suministrador y satisfacción de otros usuarios.
- Nivel de servicio aceptable, apoyo telefónico y disponibilidad de servicio técnico.
- Posibilidad de acceso a informes de evaluación independientes.
- Rendimiento satisfactorio de las combinaciones de analizador y reactivo en un esquema de evaluación de calidad externa.
- Resultados satisfactorios en una evaluación sobre el terreno.
- Facilidad de implementación en el laboratorio con cambios necesarios con respecto a la práctica existente.
- Facilidad de implementación de futuros requerimientos e incremento en la carga de trabajo.
- Suministro garantizado de reactivos y consumibles.
- Servicio posventa, entrenamiento y formación.

La decisión final se suele tomar una vez enviadas las licitaciones para el concurso, a fin de asegurar que todas las firmas comerciales tengan idénticas posibilidades, y después de lograr el más bajo de los precios adecuados. El proceso de selección debe tener en cuenta las siguientes implicaciones de coste:

- Oferta de coste por adquisición o coste por *leasing*/alquiler.
- Coste de reactivos y consumibles por año.
- Coste de los contratos de mantenimiento por año.
- Coste de las interfaces informáticas.

La medida en que cada analizador cumple los atributos *esenciales* y *deseables* puede ser puntuada de acuerdo con su importancia relativa. De esta forma, por ejemplo, la especificación estándar debe recibir una ponderación, con un valor de 10 para lo más importante y de 1 para el criterio menos importante. El cumplimiento con la especificación estándar debe recibir una *calificación*, siendo 5 la puntuación más alta y 1 la puntuación más baja.

A continuación se calcula la puntuación total multiplicando *ponderación* × *calificación* y sumándose para cada analizador.

Seguridad

Cada laboratorio debe tener sus propias recomendaciones y procedimientos de seguridad para casos de accidente o contaminación (v. cap. 25).

VARIABLES PREANALÍTICAS, INCLUYENDO LA RECOGIDA DE LA MUESTRA

Muchos resultados equivocados en las pruebas de coagulación surgen no de los errores en las pruebas sino del descuido en la fase preanalítica. Idealmente, los resultados de las pruebas de sangre deberían reflejar de forma precisa los valores *in vivo*.

Cuando se extrae sangre de un vaso, empiezan a producirse cambios en los componentes de la coagulación sanguínea. Algunos tienen lugar casi inmediatamente, como la activación plaquetaria y la iniciación del mecanismo de coagulación dependiente de la superficie de contacto.

Es esencial tomar precauciones en este estadio precoz para prevenir, o al menos minimizar, los cambios *in vitro* ajustándose a los criterios recomendados durante la recogida y el almacenamiento. Estos criterios, como se describe más abajo, han sido establecidos por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)[b].

Recogida de sangre venosa

Siempre que sea posible deben obtenerse muestras de sangre venosa, incluso del neonato. Las pruebas en sangre de origen capilar requieren modificar las técnicas, ser realizadas por personal experimentado y que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de normalidad. No constituyen, por tanto, una alternativa sencilla a las pruebas en sangre venosa. Todas las muestras sanguíneas deben ser recogidas por personal entrenado y experimentado en esta técnica. Los pacientes que requieren venopunción deben estar relajados y en un ambiente templado. Una situación de excesivo estrés y de ejercicio vigoroso causa cambios en la coagulación sanguínea y fibrinólisis.

Siempre que sea posible, las muestras venosas deben recogerse sin manguito de presión, permitiendo que la sangre entre en la jeringa por flujo continuo libre o por la presión negativa del tubo de evacuado (v. pág. 2). La oclusión venosa causa hemoconcentración, incremento de la actividad fibrinolítica, liberación de plaquetas y activación de algunos factores de la coagulación. En la mayoría de los pacientes, sin embargo, se requiere una leve presión utilizando un torniquete; éste debe aplicarse durante el menor tiempo posible (es decir, menos de 1 min). La venopunción debe ser «limpia»; las muestras sanguíneas procedentes de una vía permanente o de un catéter no deben utilizarse para realizar pruebas de hemostasia porque tienen tendencia a diluirse o a contaminarse con heparina.

Para minimizar los efectos de la activación por contacto deben utilizarse jeringas de plástico o de polipropileno de buena calidad. Si se usan contenedores sanguíneos de cristal, deben estar uniforme y adecuadamente recubiertos con silicona.

La sangre se mezcla cuidadosamente con el anticoagulante invirtiendo el tubo varias veces. Las muestras deben ser llevadas al laboratorio lo antes posible. Si se contempla

[b] Actualmente, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

la realización de pruebas urgentes de fibrinólisis, las muestras sanguíneas deben mantenerse en hielo picado hasta que se envíen al laboratorio. Los ensayos de tPA y antígeno AP1-1 se desarrollan mejor en muestras tomadas en citrato trisódico para prevenir la unión continua de tPA-AP1-1 (v. pág. 393).

Si se utiliza un sistema de tubo de vacío para recoger muestras de pruebas diferentes, la muestra de coagulación debe ser la obtenida en el segundo o tercer tubo.

La identificación del paciente es de suma importancia. Debe tenerse la precaución de etiquetar la muestra del paciente tanto junto a su cama como en el laboratorio.

Anticoagulación de la muestra sanguínea

El anticoagulante más frecuentemente utilizado para las muestras de coagulación es el citrato trisódico. Se recomienda una solución de 32 g/l (0,109 M) (v. pág. 6). Otros anticoagulantes, como el oxalato, la heparina y el EDTA no son aceptables. Los factores lábiles (factores V y VIII) son inestables en oxalato, mientras que la heparina y el EDTA inhiben directamente el proceso de coagulación e interfieren con las determinaciones de interés. Beneficios añadidos del uso de citrato trisódico son que el ion de calcio es neutralizado más rápidamente en el citrato y que las pruebas de TTPA son más sensibles a la presencia de heparina.

Para las pruebas de coagulación sanguínea rutinarias, se añaden 9 volúmenes de sangre a 1 volumen de anticoagulante (es decir, 0,55 ml de anticoagulante para un espécimen de 5 ml). Cuando el hematocrito es anormal bien por anemia o policitemia graves, la relación sangre:citrato debe ajustarse[75]. Para un espécimen de 5 ml, la cantidad de citrato debe ser la siguiente:

Hematocrito	*Citrato (ml)*
0,20	0,70
0,25	0,65
0,30	0,61
0,55	0,39
0,60	0,36
0,65	0,31
0,70	0,27

Momento de la recogida de la muestra

El momento del día en que la muestra se recoge puede ser un factor importante para la interpretación de los resultados. La actividad fibrinolítica sigue un patrón circadiano definido, con una depresión aproximadamente a las 6:00.

Debe tenerse en cuenta el momento de recogida de la muestra sanguínea en relación con la administración de fármacos (p. ej., el TTPA para monitorizar el tratamiento con heparina).

El tiempo necesario que debe transcurrir desde la administración de los concentrados de factores es muy importante. Se recomiendan los siguientes períodos:

Factor VIII, a los 15 min.
Factor IX, a los 30 min.
DDAVP, a los 45 min.

Transporte al laboratorio

Es imprescindible un servicio de recogida regular y eficiente. Es importante que las muestras sean transportadas lo más rápidamente posible para prevenir el deterioro de los factores de coagulación lábiles como son los factores V y VIII. Para ciertas investigaciones es necesario que las muestras sean colocadas en hielo una vez extraídas y que sean inmediatamente enviadas al laboratorio.

Centrifugación: preparación de plasma pobre en plaquetas

La mayor parte de los estudios de coagulación de rutina se realizan en plasma pobre en plaquetas (PPP), que se prepara mediante centrifugación a 2.000 g durante 15 min a 4 °C (aproximadamente 4.000 rpm en una centrifugadora con banco de enfriado). La muestra debe mantenerse a temperatura ambiente si va a utilizarse para pruebas como el TP, la determinación de anticoagulante lúpico (LAC) o determinaciones del factor VII, y debe mantenerse a 4 °C para otras determinaciones; las pruebas deben completarse preferiblemente en las 2 h siguientes a su recogida. Debe tenerse cuidado para no alterar la capa leucocitaria cuando se elimina el PPP.

Las muestras para evaluar la función plaquetaria, el LAC y la prueba de resistencia a la proteína C activada (APCR) no deben centrifugarse a 4 °C. Estas muestras deben prepararse mediante centrifugación a temperatura ambiente para prevenir la activación de las plaquetas y la liberación de contenidos plaquetarios como los fosfolípidos y factor V. Para la determinación del LAC y de la APCR es muy importante que el número de plaquetas y los restos plaquetarios en las muestras se reduzcan al mínimo posible. El recuento plaquetario debe ser menor de 10^4/µl. Esto se consigue mejor mediante centrifugación doble o filtración del plasma a través de un filtro de 0,2 µm.

Almacenamiento de plasma y descongelado de la muestra

Algunas pruebas, como el TP y el TTPA, se llevan a cabo en muestras frescas. Ciertas pruebas de coagulación, a menos que se necesiten practicar de forma urgente, pueden realizarse en tandas en una fecha posterior en el plasma ultracongelado. El almacenamiento de pequeñas partes alícuotas de muestras en nitrógeno líquido (–196 °C) es el método óptimo, aunque las muestras pueden congelarse a –40 °C o –80 °C durante varias semanas sin pérdida significativa de la mayor parte de su actividad hemostática. Es esencial el mezclado delicado pero minucioso de las muestras tras el descongelado y antes de realizar la determinación. Una vez descongelada, la muestra nunca debe volver a congelarse.

Algunos errores «técnicos» habituales

En las siguientes situaciones puede producirse una falsa alteración del tiempo hasta la formación del coágulo:

1. Recogida defectuosa de la muestra, lo que conduce a una coagulación parcial en curso (puede conducir a un acortamiento de los tiempos de coagulación).

2. Defecto o exceso de llenado del tubo o un hematocrito alto o bajo (puede producir que el volumen de citrato en relación con el volumen plasmático sea incorrecto; v. anteriormente).
3. Uso de un anticoagulante inadecuado, como EDTA, en la muestra.
4. Recogida de sangre a partir de una vía que ha estado en algún momento en contacto con heparina (conduce a una marcada prolongación del TTPA y del tiempo de trombina o TT).
5. Contaminación del reactivo sustitutivo plaquetario/caolín con rastros de tromboplastina (puede acortar el TTPA).
6. Retraso indebido en el análisis de la muestra.
7. Uso de pipetas inadecuadas. (Es esencial tener pruebas de la calibración de las pipetas.)
8. Mal funcionamiento de los aparatos.
9. Temperatura incorrecta en el baño.
10. Cloruro de calcio a concentración incorrecta o no preparado recientemente.

Calibración y control de calidad

Estándar de referencia (calibrador)

Existen estándares internacionales (Organización Mundial de la Salud, OMS) y nacionales disponibles para cierto número de factores de la coagulación (v. pág. 591). Para las pruebas diagnósticas es necesario tener una preparación de referencia calibrada normal, evaluada en paralelo con plasmas de los pacientes.

Dado que la concentración de algunos factores de coagulación puede variar hasta cuatro veces en muestras plasmáticas normales diferentes, no es aconsejable utilizar plasma de cualquier sujeto individual como representante de una actividad de coagulación del 100%. Cuanto mayor sea el número de donantes en el conjunto o *pool* de plasmas, mayor es la probabilidad de que la actividad coaguladora de éste sea el 100% o 1,0 u/ml. Un mínimo sugerido para un conjunto de plasmas normal es 20 donantes. Es preferible utilizar un plasma calibrado de referencia para su uso de rutina con cada ensayo. Si esto no es posible, entonces puede utilizarse un conjunto de plasmas normales preparado en el propio laboratorio, siempre que haya sido calibrado contra una preparación de referencia.

Calibración de conjuntos de plasmas estándar y procedimiento de calibración sugerido

Siempre que sea posible, el conjunto de plasmas normales debe calibrarse como se describe en el siguiente apartado contra un material de referencia congelado en seco a su vez ya calibrado contra el estándar internacional. El material de referencia puede ser un estándar nacional (p. ej., el del National Institute for Biological Standards and Control) o un estándar comercial. En ausencia de materiales de laboratorio de referencia, debe obtenerse un conjunto de plasmas normales tan grande como sea posible y asignársele un valor de 100 u/dl (1,0 u/ml). El principio más importante de la calibración es la repetibilidad, a fin de minimizar los posibles errores en cada fase de la calibración. Es necesario llevar al cabo al menos cuatro ensayos independientes, y preferentemente seis. Un ensayo independiente es un ensayo para el que se abre un nuevo vial de muestra estándar, o si no se dispone de un estándar congelado en seco, aquel para el que se prepara un nuevo grupo de diluciones a partir de plasma de referencia previamente congelado. Cada plasma debe evaluarse por duplicado; deben realizarse dos ensayos de réplica cada día, y el procedimiento debe repetirse durante al menos 4 días (cuatro ensayos independientes). Siempre que sea posible debe implicarse a más de un técnico.

La comparación debe realizarse siempre con el conjunto de plasmas normales previo. La potencia del nuevo conjunto de plasmas normal se calcula para cada uno de los ensayos replicados cada día y se calcula un valor medio global. Esta calibración también facilita una evaluación de la precisión del método utilizado.

Plasma control

En una tanda de pruebas el resultado de los controles debe figurar al lado del de los pacientes. La inclusión tanto de controles normales como anormales posibilitará la detección de una no linealidad en la curva estándar. Mientras que los estándares de referencia (calibrador) se utilizan para evaluar la exactitud, los controles se utilizan para evaluar la precisión. El control de la precisión, es decir, el registro de la variación día a día de los valores control, es un procedimiento importante en un laboratorio de coagulación. La participación en un esquema de evaluación externo de calidad (v. pág. 561) es también importante para asegurar una armonización interlaboratorios. La utilización del estándar de referencia liofilizado y de los plasmas control se ha generalizado, mientras que los conjuntos de plasmas estándar calibrados en cada laboratorio se utilizan especialmente en países con pocos recursos. Los resultados de la participación en esquemas de calidad de control externos requieren una interpretación cuidadosa. El gran número de reactivos, plasmas sustrato, preparaciones de referencia y analizadores diferentes disponibles hace difícil la comparación entre ellos. Idealmente, todas las combinaciones deben dar resultados similares, pero con frecuencia éste no es el caso y los resultados deben ser valorados para elegir de forma cuidadosa la combinación utilizada.

Un control debe ser estable y homogéneo; la potencia exacta no es importante, aunque el valor aproximado debe conocerse para seleccionar una preparación en el límite superior o inferior del intervalo normal de referencia.

Se requiere un control de sangre fresca para procedimientos como la agregación plaquetaria y debe ser obtenido de sujetos sanos «normales». Los controles frescos deben prepararse exactamente de la misma forma que la muestra del paciente. Los controles normales y anormales se suelen obtener de compañías que los comercializan.

Variabilidad de los ensayos de coagulación

Dentro de un mismo laboratorio, la variabilidad suele ser principalmente el resultado de un error de dilución, de di-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

ferencias en la composición de los reactivos, de un fallo a la hora de tener en cuenta la tendencia temporal, y de diferencias entre técnicos en sus niveles de experiencia y capacidad técnica. Un coeficiente de variación del 15-20% no es infrecuente en las determinaciones de factor VIII:C. Además, la variabilidad se incrementa si la comparación de resultados es a partir de orígenes distintos (p. ej., si las preparaciones de concentrado son estudiadas frente a plasma).

La variabilidad entre laboratorios distintos es mucho mayor. Aparte de los factores descritos para la variabilidad dentro de un mismo laboratorio, hay un efecto muy importante de las diferencias en métodos y en la composición de los reactivos. La comparabilidad entre los laboratorios mejora si se utilizan reactivos estandarizados.

La inevitable variabilidad asociada a los ensayos de coagulación hace imperativa la utilización de materiales de referencia fiables.

Rendimiento de las pruebas de coagulación

Manipulación de muestras y reactivos

Todas las muestras de plasma deben mantenerse en tubos de plástico o de cristal siliconado y ser colocadas en hielo derretido o a 4 °C hasta ser usados, excepto cuando se debe evitar la activación por el frío del factor VII y de las plaquetas, en cuyo caso el plasma se mantiene a temperatura ambiente. Todos los pipeteados deben realizarse utilizando pipetas desechables de plástico o puntas de pipeta con autodilución. Las pruebas de coagulación en sí se llevan a cabo a 37 °C en tubos de cristal de fondo redondeado de tamaño estándar (10 a 12 mm de diámetro estándar). Idealmente, todos los instrumentos de cristal deben desecharse. Si los tubos tienen que ser reutilizados tras su uso, es esencial un lavado concienzudo utilizando ácido crómico y detergente del tipo Decon 90 al 2%.

Eliminación de una tendencia temporal

La potencial inestabilidad de los reactivos biológicos utilizados en las pruebas de hemostasia hace deseable fijar los resultados a fin de reducir los errores relacionados con el tiempo. De esta forma, si pasa un tiempo significativo entre los resultados obtenidos a partir del plasma del paciente y la obtención de los resultados con la muestra control, la diferencia puede ser el resultado del deterioro de uno o más de los reactivos o del plasma en sí mismo en vez de un verdadero defecto o déficit. En el caso más simple, si hay dos muestras A y B, las lecturas deben llevarse a cabo en el orden A_1, B_1, B_2, A_2. Se puede permitir la introducción de otros especímenes insertando más letras en el diseño.

Monitorización de ensayos y detección de parámetros de valoración

La detección de la formación del coágulo como parámetro evaluado depende en cierta medida de la velocidad de su formación: cuanto menor es el tiempo de coagulación, más opaco es el coágulo y más fácil es detectarlo. Un coágulo de formación lenta puede presentar el aspecto de simples trazas de fibrina, que son difíciles de detectar a simple vista o mediante analizadores. En el trabajo manual, el observador debe intentar la adopción de una convención uniforme para seleccionar el momento en la formación del coágulo, que será aceptado como el parámetro evaluado. También es importante asegurar que el tubo pueda ser observado con su parte inferior debajo del agua o mientras es rápidamente metido y sacado para evitar su enfriado y un enlentecimiento de la formación del coágulo. Las burbujas también complican la determinación del parámetro de valoración.

Las técnicas de coagulación manuales todavía se utilizan en los esquemas de calibración de la OMS y, por tanto, deben ser vistas como una habilidad esencial a pesar de la siempre creciente tendencia a la automatización. Merece la pena recordar que no todos los resultados producidos por un analizador automático son correctos y algunas veces pueden ser resultados espurios, dudosos o incoherentes, que deben ser evaluados manualmente.

En el trabajo instrumental el coagulómetro debe demostrar que es capaz de detectar largos tiempos de coagulación de forma fiable y reproducible. Los diversos coagulómetros disponibles tienen medios diferentes para detectar el parámetro que se deseea valorar, lo que puede dificultar la comparación de los resultados. A continuación se comentan algunas de las técnicas de utilización más frecuente.

Técnicas electromecánicas

Impedancia, bola de acero (p. ej., Amelung KC10)

La cubeta de la muestra experimenta un movimiento de rotación y una bola de acero se mantiene estacionaria en un campo magnético hasta que se produce la formación de mallas de fibrina alrededor de la bola y con ello aparece el movimiento. Éste se detecta por un cambio en el campo magnético y se registra el tiempo de coagulación.

Impedancia, bola de acero (Nycomed Thrombotrack)

Una bola de acero rota bajo la influencia de un imán hasta que la formación de mallas de fibrina alrededor de la bola detiene su rotación. Esto se detecta mediante un sensor, y el tiempo de coagulación se registra.

Técnicas fotoópticas

Detección de dispersión de luz para el análisis de la coagulación (660 nm)

La turbidez durante la formación de un coágulo de fibrina viene medida como un incremento en la intensidad de la luz dispersada cuando se expone a luz en una longitud de onda de 660 nm.

Detección de luz transmitida para análisis cromogénicos (405 nm, 575 nm, 800 nm)

La producción de color conduce a un cambio en la absorbancia de la luz, lo que se detecta como un cambio en la luz transmitida. A lo largo del tiempo se calcula el cambio en la absorbancia por minuto (Δ OD/min). Pueden utilizar-

se diferentes longitudes de onda, como 405 nm, 575 nm y 800 nm.

Detección de luz transmitida en los inmunoensayos (405 nm, 575 nm, 800 nm)

El cambio en la absorbancia lumínica causado por la reacción antígeno anticuerpo es detectado como el cambio en luz transmitida. A lo largo del tiempo se calcula el cambio en absorbancia por minuto (Δ OD/min).

Análisis de la forma de la onda (Biomerieux)

La detección de transmitancia de luz con luz de Tungsteno-Halógeno se realiza a 35 longitudes de onda entre 395 y 710 nm. El análisis de la forma de la onda proporciona información adicional de los ensayos de coagulación de rutina. Por ejemplo, la señal en forma de onda bifásica A2 se asocia con sepsis y coagulación intravascular diseminada.

Nefelometría (analizadores ACL IL)

La nefelometría es la determinación de la intensidad de la luz dispersada utilizando un detector colocado en ángulos rectos con respecto a la dirección de la luz incidente pero de la misma longitud de onda que la luz incidente. El procedimiento es especialmente útil en la medición de complejos de antígenos y anticuerpos producidos por inmunoprecipitación.

Técnicas electroquímicas

Instrumentos de evaluación a la cabecera del paciente tipo INRatiómetro (Hemosense)

La tira de uso único para la medición del INR está hecha de capas laminadas de plástico transparente. Cada tira contiene un pocillo para la muestra donde se aplica la sangre, tres canales a través de los cuales la muestra sanguínea fluye para alcanzar las áreas de evaluación, reactivos para empezar el proceso de coagulación y los electrodos que se comunican con el medidor de INR. El dispositivo detecta un cambio en la resistencia eléctrica cuando la sangre se coagula.

Análisis de ensayos

Los cambios registrados por los métodos previamente descritos pueden analizarse de varias formas para proporcionar un dato final. A continuación se describen algunos de estos métodos.

Método de detección de porcentajes (fig. 16.2)

Después del inicio de la reacción de coagulación, la intensidad de la luz dispersada se monitoriza y los valores basal (bH) y máximos se determinan. En el método de detección porcentual el bH es considerado como el 0% y el cambio en dispersión (dH) es tomado como el 100%. Un cambio porcentual arbitrariamente seleccionado es entonces considerado como el criterio de valoración, y el tiempo tomado para alcanzar este punto es el tiempo de coagulación. Este valor de detección porcentual puede situarse de forma opcional entre el 2 y el 80%. Habitualmente se utiliza el 50%, punto en el que la tasa de cambio de dispersión lumínica es mayor y la velocidad de la reacción de polimerización del monómero de fibrina, por ejemplo, es alta.

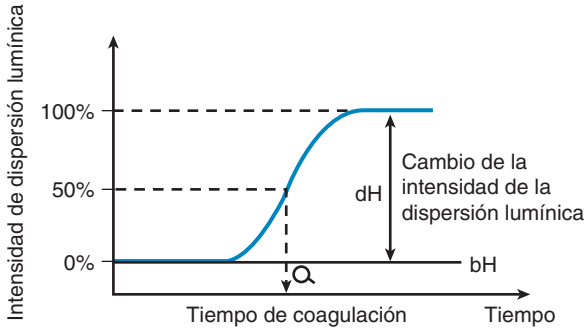


Figura 16.2. Determinación a punto final: método de detección de porcentaje.

Método de tasa (fig. 16.3)

En un punto predefinido después del inicio de la reacción cinética se monitoriza el incremento en absorbancia por minuto. En un punto final predeterminado se realiza la medición del incremento final en absorbancia por minuto. El programa calcula después la tasa del incremento de absorbancia por minuto entre estas dos determinaciones en sendos puntos temporales. El valor de absorbancia calculado se expresa como datos crudos. La ΔOD/min puede calcularse y utilizarse para construir una curva estándar.

VLin integral (fig. 16.4)

El método VLin integral evalúa el punto temporal en el que la reacción alcanza su incremento más alto. En un punto predefinido desde el inicio de la reacción cinética, el algoritmo monitorizará la reacción y determinará cuándo empieza una determinación de absorbancia creciente. A continuación, el algoritmo monitoriza la pendiente de la señal

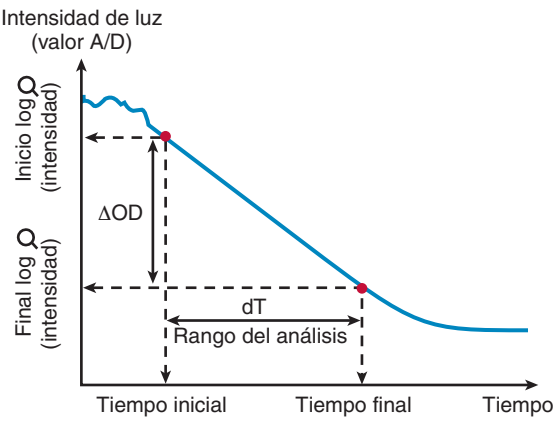


Figura 16.3. Análisis de reacción: método de tasa. Se utiliza para ensayos cromogénicos. (Reproducido con permiso de Sysmex UK Ltd.)

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

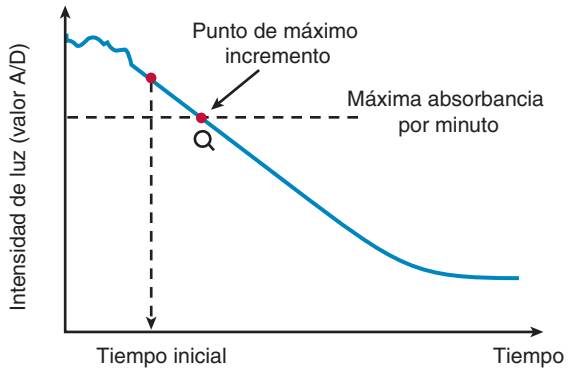


Figura 16.4. Análisis de reacción: VLin Integral (p. ej., ensayos inmunológicos). (Reproducido con permiso de Sysmex UK Ltd.)

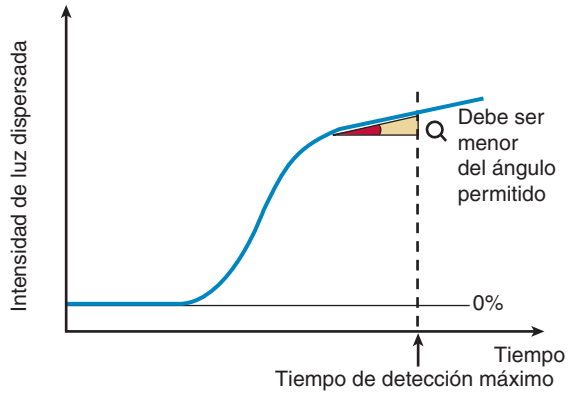


Figura 16.5. Ejemplos de señales de error que pueden requerir coagulación manual: «análisis por encima del tiempo». (Reproducido con permiso de Sysmex UK Ltd.)

de curva creciente utilizando una regresión polinómica. Después se aplica una regresión lineal para hallar el punto de velocidad máxima. Se define el límite del rango lineal alrededor de este punto, y la integral del área entre esos puntos se utiliza para calcular la reacción en absorbancia por minuto en el pico. Es un algoritmo dinámico basado en la intensidad de la reacción. Utilizar este método permite incrementar la sensibilidad analítica, extender el rango de medición, reducir el tiempo de medición y mejorar la fiabilidad de la monitorización de una reacción inmunológica cuando hay un exceso de antígeno. El método de evaluación mediante VLin integral puede utilizarse en ensayos inmunológicos.

Análisis por encima del tiempo *(analysis time over)* (fig. 16.5)

La comprobación del análisis por encima del tiempo es capaz de detectar si el criterio de valoración de la reacción es correcto. Si el ángulo final de la reacción en la muestra es mayor que el ángulo máximo permitido en el momento de detección, el resultado será marcado con un error de «análisis por encima del tiempo». Esta situación se produce cuando las muestras que se evalúan presentan tiempos de coagulación prolongados.

Los pasos que deben seguirse en caso de «análisis por encima del tiempo» son los siguientes:

1. Evaluar la muestra para determinar una posible contaminación por anticoagulantes, hemólisis, lipemia, etc.
2. Verificar la entrega de muestra y reactivo.
3. Programar el «tiempo máximo de lectura» con un valor superior y reanalizar la muestra.
4. Si el reanálisis de la muestra produce un valor numérico sin señal de error, el resultado puede validarse y comunicarse.
5. Si el reanálisis da un mensaje de «análisis por encima del tiempo» de nuevo, la muestra puede no ser capaz de formar un coágulo firme. En estas situaciones el tiempo de coagulación debe evaluarse manualmente.

Exceso en el nivel de turbidez (fig. 16.6)

Si el dH excede la capacidad de detección del convertidor A/D, el resultado no se comunicará y se sospechará que la muestra de plasma está turbia o lipidémica.

Pasos que deben seguirse en caso de exceso en el nivel de turbidez:

1. Evaluar la muestra en busca de turbidez, lipemia, etc.
2. Verificar el envío de la muestra y del reactivo.
3. Diluir la muestra para para dosificar fibrinógeno con tampón veronal de Owren y reanalizar.
4. Si el reanálisis de la muestra produce un valor numérico sin alarma de error, el resultado se puede comunicar.
5. Las pruebas de coagulación como el TP, TTPA y el TT deben hacerse manualmente.

Análisis de la forma de la onda

Es importante tener en cuenta que la coagulación es un proceso *dinámico* y que la determinación de los indicadores estáticos no necesariamente proporciona información sobre la calidad del coágulo o la cinética de su formación.

Perfiles de coágulos: ondas de forma normales y anormales de la coagulación TTPA (fig. 16.7)

La información de la dinámica de la formación del coágulo puede también extraerse de los perfiles ópticos generados cuando se llevan a cabo ensayos de TP o TTPA. Se ha demostrado que tales perfiles (ondas de coagulación) muestran un patrón diferente bajo ciertas condiciones en comparación con la normalidad. Además, la forma de este patrón es predecible para la anomalía concreta y el término «firma del coágulo» se ha utilizado en este contexto.

La señal A2 en el sistema MDA identifica la presencia de una onda TTPA bifásica que frecuentemente aparece en pacientes con CID, y se ha comunicado[16] una alta sensibilidad (98%), especificidad (98%) y valor predictivo positivo (74%).

Es importante reseñar que la onda bifásica del TTPA ha sido también observada en muestras de pacientes a los que

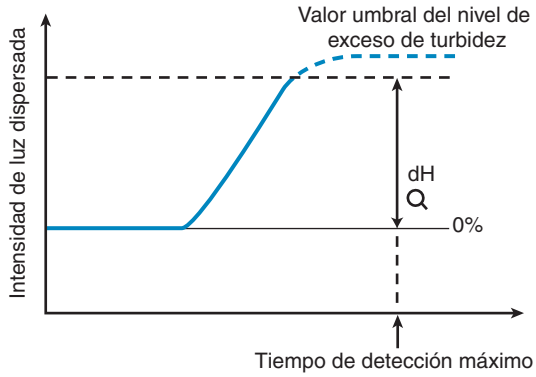


Figura 16.6. Ejemplos de señales de error que pueden requerir pruebas manuales: «exceso de nivel de turbidez». (Reproducido con permiso de Sysmex UK Ltd.)

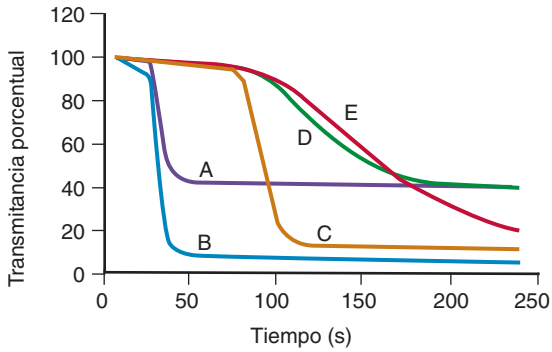


Figura 16.7. Perfiles de la coagulación: ondas de coagulación del tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA) normal y anormal. A: Espécimen normal; TTPA = 29 s, fibrinógeno = 2,89 g/l. B: Respuesta bifásica en un espécimen con sospecha de coagulación intravascular diseminada (CID) con un TTPA normal (28,5 s) y fibrinógeno elevado (6,74 g/l). C: Paciente tratado con heparina (0,52 a-Xa U/ml); TTPA alargado (81,2 s) y fibrinógeno elevado (5,54 g/l). D: Espécimen deficitario en factor VIII (<1%), con alargamiento de TTPA (84,1 s) y reducción de fibrinógeno (1,56 g/l). E: Espécimen deficitario en factor IX (<1%) con TTPA prolongado (83,4 s) y fibrinógeno normal (2,94 g/l). (Reproducido con permiso de Biomerieux.)

no se ha diagnosticado CID por los criterios estándar. A este respecto puede indicar una enfermedad oculta o emergente potencialmente grave que se asociaría a la activación de la coagulación. Es necesario realizar ulteriores investigaciones clínicas y de laboratorio.

Mecanismo molecular de la onda bifásica: PCR-CL

El desarrollo de la onda bifásica es consecuencia de la formación de un complejo dependiente de iones metálicos divalentes entre la proteína C reactiva (PCR) y de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y, en menor medida, lipoproteínas de densidad intermedia (IDL)[17].

Este complejo PCR-lipoproteínas se ha denominado PCR-CL. En la determinación del TTPA, cuando el plasma citratado se vuelve a calcificar, la formación de este complejo conduce a una reducción en la transmisión lumínica, detectada por la primera pendiente en la onda bifásica.

Reactivos de uso común

Algunos reactivos son comunes a la mayoría de las pruebas de primera línea. Estos reactivos se describen a continuación, mientras que los reactivos específicos para una prueba o ensayo específico se describen junto con los detalles de la prueba de interés.

$CaCl_2$

La solución operativa se prepara mejor a partir de una solución molar comercial. Deben prepararse con frecuencia pequeños volúmenes de concentraciones 0,025 mol/l y almacenarse durantes breves períodos de tiempo para evitar la proliferación de microorganismos. El $CaCl_2$ previamente calentado debe siempre desecharse al final del día de trabajo.

Solución salina tamponada con barbital

Se recomienda una solución salina tamponada con barbital de pH 7,3-7,4 para la mayoría de pruebas de coagulación. Véase la página 589 para la preparación de solución salina tamponada con barbital, pH 7,4.

Tampón de glioxalina

Disolver 2,72 g de tampón de glioxalina (imidazol) y 4,68 g de NaCl en 650 ml de agua. Añadir 148,8 ml de HCl 0,1 mol/l y ajustar el pH a 7,4. Ajustar el volumen a 1 l con agua.

Tampón veronal de Owren

Acetato sódico: 3,89 g.
Barbital sódico: 5,89 g.
Cloruro sódico: 6,8 g.
Disolver las sales en 800 ml de agua.
Añadir 21,5 ml de HCl 1 mol/l, llevar hasta 1 l con agua, mezclar y verificar que el pH es 7,4.

Plasmas deficitarios en factores

En muchos bioensayos se requieren plasmas deficitarios en factores específicos. Pueden obtenerse de individuos con déficits congénitos del factor, pero con frecuencia estos pacientes habrán sido tratados con concentrados de plasma y existe el peligro de infección. Muchos laboratorios utilizan plasmas comerciales que se han hecho deficitarios en el factor mediante inmunodepleción y a continuación han sido liofilizados. Sin embargo, es importante establecer que estos plasmas son completamente deficitarios en el factor de interés. Una vez reconstituidos, los plasmas liofilizados deben ser mezclados con suavidad y dejarse reposar durante 20 min antes de utilizarlos. Si se utiliza un analizador de coagulación automatizado, el plasma deficitario en factores debe ser colocado en posición adecuada 10 min antes de realizar la prueba.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

ESTUDIO BÁSICO DE LA COAGULACIÓN

Las pruebas básicas de coagulación suelen realizarse cuando no se tiene un diagnóstico específico *in mente* y en ausencia de cualquier indicación clínica de un trastorno de la hemostasia. Puede haber numerosas razones para esto y las pruebas realizadas pueden dar pistas para el diagnóstico o pueden detectar un riesgo no sospechado que incrementa el riesgo de sangrado postoperatorio. La selección y extensión de las pruebas realizadas en este proceso de evaluación variará entre hospitales. Nuestra práctica habitual es realizar determinación de TP, TTPA, TT y fibrinógeno.

Tiempo de protrombina

Principio

La prueba de TP determina el tiempo de coagulación del plasma en presencia de una concentración óptima de extracto tisular (tromboplastina) e indica la eficiencia global del sistema de coagulación extrínseco. Aunque originalmente pensada para medir la protrombina, actualmente se sabe que la prueba depende también de reacciones con los factores V, VII y X y de la concentración de fibrinógeno del plasma[18].

Reactivos

Muestras plasmáticas de pacientes y controles

El plasma pobre en plaquetas (PPP) del paciente y de los controles se obtiene como se describe en la página 337. Debe reseñarse que el plasma almacenado a 4 °C puede tener un TP acortado como resultado de la activación del factor VII en condiciones de frío[19].

Tromboplastina

Las tromboplastinas en origen fueron extractos tisulares obtenidos de diferentes especies y diferentes órganos con contenido en factor tisular y fosfolípidos. A causa del riesgo potencial de infecciones virales y de otros tipos resultado de la manipulación del cerebro humano, éste ya no se utiliza como fuente de tromboplastina. La mayoría de las tromboplastinas animales actualmente en uso son extractos de cerebro o pulmón de conejo. En la página 590 se describe un método de laboratorio para realizar la preparación de cerebro de conejo.

La introducción de tromboplastinas recombinantes ha conducido a abandonar la tromboplastina de cerebro de conejo. Se fabrican utilizando factor tisular humano recombinante producido por *Escherichia coli* y fosfolípidos sintéticos, que no contienen ningún otro factor de coagulación como protrombina, factor VII y factor X. Por consiguiente, son altamente sensibles a los déficits en factores y a las muestras de plasma de pacientes tratados con anticoagulantes orales y presentan un índice de sensibilidad internacional (ISI) cercano a 1.

Cada preparación tiene una sensibilidad diferente para los déficits y defectos de factores de coagulación, en especial el defecto inducido por los anticoagulantes orales (v. cap. 18). Para el control de la anticoagulación oral se debe utilizar una preparación calibrada frente a la tromboplastina internacional de referencia; la tromboplastina calibrada comercializada tiene su ISI determinado y claramente etiquetado. Es importante recordar que algunas tromboplastinas no son sensibles a un déficit aislado en factor VII y que la utilización de tromboplastina animal para el análisis de muestras humanas puede arrojar un resultado falso solamente como resultado de diferencias entre especies. Si el fabricante no establece en la bibliografía acompañante que el reactivo es sensible al déficit en factor VII, es recomendable evaluar si es capaz de detectar este déficit realizando un TP en un plasma que se conozca que es deficitario en dicho factor.

$CaCl_2$

0,025 mol/l.

Método

Pipetear 0,1 ml de plasma en un tubo de cristal colocado en un baño y añadir 0,1 ml de tromboplastina. Esperar 1-3 min para permitir que la mezcla se temple. A continuación, añadir 0,1 ml de $CaCl_2$ a 37 °C y activar el cronómetro. Mezclar el contenido del tubo y registrar el punto final de la reacción. Realizar la prueba por duplicado sobre el plasma del paciente y el plasma control. Cuando un número variable de muestras se evalúe en forma de tanda, las muestras y controles deben escalonarse adecuadamente para eliminar el sesgo temporal. Algunas tromboplastinas contienen cloruro cálcico, en cuyo caso 0,2 ml de tromboplastina se añaden a 0,1 ml de plasma y se empieza a cronometrar de forma inmediata.

Expresión de los resultados

Los resultados se expresan como la media de las lecturas por duplicado en segundos o como la proporción entre el tiempo medio del plasma del paciente con respecto al tiempo medio del plasma control normal. El plasma control se obtiene a partir de 20 hombres y mujeres normales (mujeres no embarazadas ni tomando anticonceptivos orales), y se calcula la media logarítmica del TP normal (LMNPT). Para más detalles y discusión de la importancia de la prueba de TTP en una fase para el control de anticoagulantes orales, situación en que los resultados pueden ser comunicados como una relación normalizada internacional (International Normalized Ratio [INR]), véase el capítulo 18.

Valores normales

Los valores normales dependen de la tromboplastina utilizada, de la técnica exacta y de si se aplica la lectura visual o instrumental del indicador final de evaluación considerado. Con la mayoría de tromboplastinas de conejo el intervalo normal del TTP está entre 11 y 16 s; para la tromboplastina humana recombinante es un poco más corto (10-12 s). Cada laboratorio debe establecer su propio intervalo de normalidad.

Interpretación

Las causas más frecuentes de alargamiento del TP en una fase son las siguientes:

1. Administración de anticoagulantes orales (antagonistas de la vitamina K).
2. Enfermedad hepática, especialmente obstructiva.
3. Déficit de vitamina K.
4. Coagulación intravascular diseminada.
5. Rara vez, un déficit o defecto previamente no diagnosticado de los factores VII, X, V o protrombina (v. pág. 351). *Nota*: con los déficits de protrombina, factor X o factor V el TTPA también se prolongará.

Tiempo de tromboplastina parcial activado

Otros términos para denominar el TTPA son tiempo parcial de tromboplastina con caolín (PTTK) y tiempo de coagulación de cefalina caolín (KCCT); estas denominaciones reflejan los métodos utilizados para llevar a cabo la prueba.

Principio

La prueba mide el tiempo de coagulación del plasma después de la activación de los factores de contacto pero sin la existencia de tromboplastina tisular añadida y, por tanto, indica la eficiencia global de la vía intrínseca. Para estandarizar la activación de los factores de contacto, el plasma es primero preincubado durante un período determinado, en el que se expone a un activador de contacto como caolín, sílice o ácido elágico. Durante esta fase de la prueba se produce factor XIIa, que disocia el factor XI a factor XIa, pero la coagulación no sobrepasa este paso en ausencia de calcio. Después de la recalcificación, el factor XIa activa el factor IX y continúa la cascada. Se proporciona un fosfolípido estandarizado para permitir que la prueba sea realizada en PPP. El test depende no sólo de los factores de contacto y de los factores VIII y IX, sino también de las reacciones con los factores X, V, protrombina y fibrinógeno. Es además sensible a la presencia de anticoagulantes circulantes (inhibidores) y heparina.

Reactivos

PPP

Del paciente y de un control, almacenados como se describe en la página 337.

Caolín

Se utiliza caolín 5 g/l (grado de laboratorio) en solución salina tamponada con barbital, pH 7,4 (v. pág. 588). Añadir unas cuantas gotas para ayudar a resuspender. La suspensión es estable a temperatura ambiente. Pueden también utilizarse otras sustancias insolubles con actividad de superficie como sílice, celita o ácido elágico.

Fosfolípidos

Se dispone de muchos reactivos con diferentes contenidos en fosfolípidos.

Cuando se selecciona un reactivo para el TTPA, es importante establecer que la combinación activador-fosfolípido es sensible a los déficits de factores VIII:C, IX y XI a concentraciones de 0,35 a 0,4 UI/ml. Los reactivos que no consiguen detectar reducciones de este grado presentan sensibilidades demasiado bajas para su uso rutinario. El sistema debe también responder a la heparina no fraccionada a lo largo del rango terapéutico aproximadamente entre 0,3 y 0,7 u/ml. Además, algunos laboratorios desearán que el sistema sea sensible a la presencia de anticoagulantes tipo lupus.

$CaCl_2$

0,025 mol/l.

Método

Mezclar volúmenes iguales del reactivo fosfolipídico y de la suspensión de caolín y dejar en un tubo de cristal en el baño a 37 °C. Colocar 0,1 ml de plasma en un tubo nuevo de cristal. Añadir 0,2 ml de la solución fosfolípido-caolín, mezclar los contenidos y activar el cronómetro simultáneamente. Dejar a 37 °C durante 10 min agitando ocasionalmente. Exactamente a los 10 min añadir 0,1 ml de $CaCl_2$ templado previamente y activar un segundo cronómetro. Registrar el tiempo necesario para que la mezcla coagule. Repetir la prueba al menos una vez tanto con el plasma del paciente como con el plasma control. Es posible hacer cuatro pruebas en intervalos de 2 min si se dispone de suficientes cronómetros.

Expresión de los resultados

Los resultados se expresan como la media de los tiempos de coagulación por pares.

Intervalo normal

El intervalo normal característicamente se sitúa entre 26 y 40 s. Los tiempos reales dependen de los reactivos utilizados y de la duración del período de preincubación, que varía de acuerdo con las recomendaciones de cada fabricante para los diferentes reactivos. Estas variables también alteran en gran medida la sensibilidad de la prueba a déficits menores o moderados del sistema de activación por contacto. Los laboratorios pueden elegir las condiciones adecuadas para alcanzar la sensibilidad que requieren. Cada laboratorio debe calcular su intervalo de normalidad.

Interpretación

Las causas más frecuentes de un TTPA prolongado son:

1. Coagulación intravascular diseminada.
2. Enfermedad hepática.
3. Transfusión masiva con hematíes deplecionados de plasma.
4. Administración de o contaminación con heparina u otros anticoagulantes.
5. Un anticoagulante circulante (inhibidor).
6. Déficit de un factor de la coagulación distinto al factor VII.

El TTPA también se prolonga de forma moderada en pacientes que toman anticoagulantes orales y en presencia de déficit de vitamina K. Ocasionalmente, un paciente con hemofilia no diagnosticada previamente o con otro trastorno de la coagulación congénito se presenta con un TTPA prolongado aislado. Si el TTPA del paciente es anormalmente

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

largo, debe realizarse una prueba sobre mezcla de concentraciones equivalentes (v. más adelante).

¿Déficit o anticoagulante circulante?

En los casos con un TTPA alargado, debe analizarse una mezcla 50:50 de plasma normal para distinguir entre el déficit factorial y el efecto de un inhibidor (v. pág. 354).

Tiempo de trombina

Principio

La trombina se añade al plasma y se mide el tiempo de coagulación. El TT se ve afectado por la concentración y reacción del fibrinógeno y por la presencia de sustancias inhibidoras, incluyendo los productos de degradación de fibrinógeno/fibrina (PDF) y la heparina. El tiempo de coagulación y el aspecto del coágulo son igualmente informativos.

Reactivos

PPP

Del paciente y de un control.

Solución de trombina

Se utiliza una trombina bovina comercializada. Se almacena congelada como una solución de 50 unidades NIH, y es diluida en fresco en solución salina tamponada con barbital en un tubo de plástico para dar un tiempo de coagulación con un plasma normal de 15 s (aproximadamente suele ser 7-8 unidades NIH de trombina por ml). Tiempos más cortos con un plasma normal pueden fracasar en la detección de alteraciones leves.

Método

Añadir 100 µl de solución de trombina a 200 µl de plasma control en un tubo de cristal a 37 °C y poner en marcha el cronómetro. Medir el tiempo de coagulación y observar la naturaleza del coágulo (p. ej., si es transparente u opaco, firme o friable, etc.). Repetir el procedimiento con dos tubos que contengan el plasma del paciente por duplicado y después con una segunda muestra de plasma control.

Expresión de los resultados

Los resultados se expresan como la media de los tiempos de coagulación por duplicado en segundos para el plasma control y el plasma evaluado.

Intervalo normal

El TT de un paciente no debe exceder una diferencia de 2 s con respecto al control (es decir, 15-19 s). Tiempos de 20 s y superiores son definitivamente anormales.

Interpretación de los resultados

Las causas más frecuentes de prolongación del TT son:

1. Hipofibrinogenemia como la hallada en la CID y, más rara vez, en un defecto o déficit congénito.
2. Concentraciones elevadas de PDF, como se encuentran en la CID o en la enfermedad hepática.
3. La prolongación extrema del TT es casi siempre resultado de la presencia de heparina, la cual interfiere con la reacción trombina-fibrinógeno. Si se sospecha la presencia de heparina, debe llevarse a cabo un tiempo de reptilase (v. pág. 349). La heparina de bajo peso molecular (HBPM) produce sólo una ligera prolongación de los niveles terapéuticos.
4. Disfibrinogenemia, heredada o adquirida, en la enfermedad hepática o en los neonatos.
5. Hipoalbuminemia.

El acortamiento del TT tiene lugar en alteraciones de la activación de la coagulación.

Si la polimerización de la fibrina es anormal, se halla un coágulo voluminoso transparente, como ocurre en el caso de la enfermedad hepática y en algunas disfibrinogenemias congénitas.

Una elevación grosera de la concentración de fibrinógeno plasmático puede también prolongar el TT. Puede procederse a la corrección diluyendo el plasma del paciente con solución salina (v. pág. 348).

Determinación del fibrinógeno

Se han diseñado numerosos métodos para determinar la concentración de fibrinógeno, incluyendo técnicas de coagulación, inmunológicas, físicas y nefelométricas, y todas tienden a dar resultados ligeramente distintos, presumiblemente al menos en parte por la naturaleza heterogénea del fibrinógeno plasmático[20]. Muchos analizadores automáticos proporcionan actualmente una concentración de fibrinógeno estimada a partir de los cambios en la coagulación durante el TTP (fibrinógeno derivado-TP). Éste es un método simple, económico y ampliamente extendido. Sin embargo, tiende a dar estimaciones superiores de fibrinógeno que el ensayo de Clauss y es inadecuado en algunos estados patológicos y en pacientes que están anticoagulados[21,22]. Se han publicado guías sobre métodos de determinación del fibrinógeno y recomiendan la técnica de Clauss para la aplicación de rutina en el laboratorio[23].

Análisis del fibrinógeno (técnica de Clauss)[24]

Principio

El plasma diluido es coagulado con una solución potente de trombina; el plasma debe diluirse para dar un bajo nivel de cualquier inhibidor (p. ej., PDF y heparina). Debe utilizarse una solución potente de trombina para que el tiempo de coagulación sea independiente de la concentración de trombina a lo largo de un amplio intervalo.

Reactivos

Plasma de calibración. Con un nivel conocido de fibrinógeno calibrado frente al estándar internacional de referencia.

PPP. Del paciente y de un control.

Solución de trombina. Reconstituida extemporáneamente a 100 unidades NIH por ml en 9 g/l de NaCl.
Tampón veronal de Owren, pH 7,4. Véase página 341.

Método

Se preparará una curva de calibración cada vez que la tanda de reactivo de trombina se cambie o exista una desviación en los resultados control; se utiliza para calcular los resultados de muestras plasmáticas desconocidas.

Realizar diluciones en el plasma de calibración en tampón veronal para tener un rango de concentraciones de fibrinógeno (es decir, 1 en 5, 1 en 10, 1 en 20 y 1 en 40). Una parte de cada dilución (0,2 ml) es calentada a 37 °C, se le añade 0,1 ml de solución de trombina, y se mide el tiempo de coagulación. Cada prueba debe llevarse a cabo por duplicado. Se debe representar el tiempo de coagulación frente a la concentración de fibrinógeno en g/l en papel log/log. La concentración 1 en 10 se considera el 100%, y debe haber una línea recta de conexión entre los tiempos de coagulación desde 5 hasta 50 s. Realizar una dilución 1/10 de cada muestra problema y coagular 0,2 ml de la dilución con 0,1 ml de trombina.

La concentración de fibrinógeno puede derivarse directamente del gráfico si el tiempo de coagulación se sitúa entre 5 y 50 s. Sin embargo, fuera de este intervalo de tiempo se requerirá realizar una dilución diferente del ensayo y una corrección matemática del resultado (es decir, si el nivel de fibrinógeno es bajo y se requiere una dilución 1/5, dividir la respuesta por 2 y para una dilución 1 en 20 multiplicar la respuesta por 2).

El coágulo formado por este método puede ser «friable» debido a que el plasma ha sido diluido, y la detección del indicador final de la reacción puede ser más fácil con un equipo óptico o mecánico automatizado. Éstos han sido evaluados con sustratos adecuados y han dado resultados razonablemente constantes[25]. La elevada concentración de trombina utilizada eleva el riesgo de arrastre en pruebas subsiguientes.

Intervalo normal

El intervalo normal es 1,8-3,6 g/l.

Interpretación

La determinación de fibrinógeno por el método de Clauss suele ser baja en la disfibrinogenemia heredada pero es insensible a heparina a menos que el nivel de ésta sea muy alto (>0,8 u/ml). Altos niveles de PDF, >190 μg/ml, pueden también interferir con el ensayo[26]. Debido a que el ensayo cronométrico de Clauss es un ensayo funcional, dará por lo general una indicación relevante de la función del fibrinógeno en plasma. Cuando se sospecha la existencia de un trastorno heredado del fibrinógeno, debe obtenerse una estimación fisicoquímica (p. ej., estimación del fibrinógeno por el peso del coágulo o fibrinógeno total coagulable o una determinación inmunológica; v. pág. 341). Si existe una disfibrinogenemia, se manifestará como una discrepancia entre el ensayo de Clauss (funcional) y la cantidad física de fibrinógeno presente.

Recuento plaquetario

Antes de considerar una posterior investigación de un trastorno hemorrágico sospechado debe evaluarse siempre el recuento plaquetario (v. cap. 3).

INTERPRETACIÓN DE LAS PRUEBAS DE PRIMERA LÍNEA

El patrón de anomalías obtenido utilizando las pruebas de primera línea descritas previamente suele indicar de forma razonablemente clara el defecto subyacente y determina las pruebas adecuadas requeridas para definirlo. Los patrones se subrayan en la tabla 16.3. Las pruebas ulteriores, que incluyen determinaciones de factores específicos y pruebas para la CID, se describen en las siguientes secciones.

EXPLORACIONES DE SEGUNDA LÍNEA

Las investigaciones relevantes de segunda línea se describen con cada uno de los patrones de alteraciones detectados por las pruebas de primera línea.

1.

TP	**Normal**
TTPA	**Normal**
Tiempo de trombina	**Normal**
Fibrinógeno	**Normal**
Recuento plaquetario	**Normal**

Si todas las pruebas de primera línea son normales en un paciente que continúa sangrando en el lugar de una lesión o después de una cirugía (o tiene antecedentes de dichas formas de hemorragia), hay varios diagnósticos posibles:

1. Un trastorno de la función plaquetaria, bien congénito bien adquirido.
2. Enfermedad de Von Willebrand (EVW) en que el factor VIII no está suficientemente bajo para causar la prolongación del TTPA. Esto es bastante frecuente en los casos leves.
3. Un trastorno leve de la coagulación que está por debajo de la sensibilidad de las pruebas de rutina para ser detectado o que ha sido enmascarado por la administración de productos sanguíneos. Esto incluirá un déficit leve de factor VIII (p. ej., 30% del valor normal).
4. Déficit de factor XIII.
5. Trastorno vascular de la hemostasia.
6. Sangrado de un vaso o vasos gravemente dañados con hemostasia normal.
7. Trastorno de la fibrinólisis como el déficit de antiplasmina o PAI-I.
8. Administración de HBPM.

Las pruebas de segunda línea requeridas en esta situación son los ensayos de factores específicos para los déficits sos-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 16.3. Pruebas de primera línea utilizadas en un fracaso de la hemostasia

	Prueba					
	TP	TTPA	TT	Fibrinógeno	Recuento plaquetario	Trastorno
1.	N	N	N	N	N	Hemostasia normal Trastorno de función plaquetaria Déficit de factor XIII Trastorno de la hemostasia vascular Déficit de factor de coagulación leve/enmascarado Enfermedad de Von Willebrand leve Trastorno de fibrinólisis
2.	Alargado	N	N	N	N	Déficit de factor VII Anticoagulación oral precoz Anticoagulante lúpico (con algunos reactivos) Déficit leve II, V, o X
3.	N	Alargado	N	N	N	Factor VIII, IX, XI, XII, precalicreína Déficit de HMWK Enfermedad de Von Willebrand Anticoagulante circulante (p. ej., lupus) Déficit leve en II, V, o X
4.	Alargado	Alargado	N	N	N	Déficit de vitamina K Anticoagulantes orales Déficit de factores V, X o II Déficit de múltiples factores (p. ej., fallo hepático) Déficit combinado V + VIII
5.	Alargado	Alargado	Alargado	N o anormal	N	Heparina (gran cantidad) Enfermedad hepática Trastorno/déficit de fibrinógeno Inhibición de la polimerización de fibrina Hiperfibrinólisis
6.	N	N	N	N	Bajo	Trombocitopenia
7.	Alargado	Alargado	N	N o anormal	Bajo	Transfusión masiva Enfermedad hepática
8.	Alargado	Alargado	Alargado	Bajo	Bajo	Coagulación intravascular diseminada Fallo hepático agudo

HMWK, cininógeno de alto peso molecular; N, normal.

pechados o pruebas de cribado adecuadas como el sistema PFA-100 (v. pág. 358), el tiempo de sangría o la prueba de solubilidad del coágulo. Recuérdese que algunas HBPM pueden estar presentes a niveles terapéuticos sin que se objetiven alteraciones en las pruebas de evaluación de la coagulación; una determinación de anti-Xa revelará su presencia.

2.

TP	**Alargado**
TTPA	**Normal**
Tiempo de trombina	**Normal**
Fibrinógeno	**Normal**
Recuento plaquetario	**Normal**

Esta combinación de resultados se halla en las siguientes situaciones:

1. En el déficit de factor VII congénita o secundaria a enfermedad hepática o a déficit de vitamina K.
2. Al inicio del tratamiento con anticoagulantes orales.
3. Algunas tromboplastinas son sensibles a los anticoagulantes tipo lupus y algunos reactivos TTPA son insensibles, dando lugar a este patrón de resultados.
4. Dependiendo de los reactivos utilizados, déficits leves de los factores II, V, o X pueden causar la prolongación del TP, mientras que el TTPA se mantiene en el intervalo normal.

Debe realizarse una prueba de mezclas de plasma. La determinación del factor VII se describe más tarde. A partir de la historia suele ser posible, aunque no siempre, establecer si el paciente ha recibido anticoagulantes orales. Deben realizarse pruebas específicas de lupus y ensayos de facto-

res específicos, según las indicaciones de los resultados de las pruebas sobre las mezclas de plasmas. Deben obtenerse determinaciones bioquímicas de la función hepática.

3.

TP	**Normal**
TTPA	**Alargado**
Tiempo de trombina	**Normal**
Fibrinógeno	**Normal**
Recuento plaquetario	**Normal**

Un TTPA prolongado aislado se halla en las siguientes situaciones:

1. Déficits congénitos o defectos de la vía intrínseca (p. ej., déficit de factor VIII, factor IX, factor XI y factor XII), así como en los déficits de precalicreína y la presencia de HBPM.
2. Dependiendo de los reactivos utilizados, los déficits leves de los factores II, V, o X pueden prolongar el TTPA, mientras el TP se mantiene dentro del intervalo normal.
3. EVW debida a bajos niveles de factor VIII y cuando pueda asociarse con una prolongación del tiempo de sangría.
4. En presencia de anticoagulantes circulantes (inhibidores).
5. Heparina (una causa frecuente), ya porque el paciente está sometiéndose a tratamiento o debido a la contaminación de la muestra. Sin embargo, el TT es extremadamente sensible a la heparina no fraccionada y se verá también prolongado. Un tiempo de reptilase confirmará esto si es necesario. La detección de HBPM puede requerir la determinación de anti-Xa como se estableció previamente.

El siguiente paso diagnóstico es establecer si el paciente presenta un déficit o un inhibidor realizando la prueba de mezclas 50:50 descrita en la página 354. Las pruebas de mezclado deben realizarse inmediatamente, y deben ir seguidas de los ensayos o pruebas específicas como se describe más adelante.

4.

TP	**Alargado**
TTPA	**Alargado**
Tiempo de trombina	**Normal**
Fibrinógeno	**Normal**
Recuento plaquetario	**Normal**

Las principales causas de TP y TTPA prolongados son las siguientes:

1. Falta de vitamina K. En este caso el TP suele estar relativamente más alargado que el TTPA.
2. La administración de anticoagulantes orales. El TP está normalmente más prolongado que el TTPA.
3. La enfermedad hepática da lugar a múltiples déficits factoriales. (En algunos casos el fibrinógeno puede también ser anormal.)
4. Defectos infrecuentes congénitos o adquiridos de los factores V, X y protrombina, y el déficit combinado de factores V y VIII.

Las mezclas de plasma utilizando el TTP pueden ser útiles si no hay historia de toma de anticoagulantes orales ni razón obvia para un fallo en la absorción de la vitamina K (p. ej., alimentación parenteral, tratamiento antibiótico a largo plazo, etc.). Si las anomalías se corrigen, deben llevarse a cabo ensayos de factores de la coagulación específicos.

5.

TP	**Alargado**
TTPA	**Alargado**
Tiempo de trombina	**Alargado**
Fibrinógeno	**Normal/anormal**
Recuento plaquetario	**Normal**

Se detectan alteraciones en las tres pruebas de cribado de la coagulación en las siguientes situaciones:

1. En presencia de heparina no fraccionada (el TT suele estar desproporcionadamente alargado).
2. En las hipofibrinogenemias, afibrinogenemias y disfibrinogenemias.
3. En algunos casos de enfermedad hepática.
4. En la hiperfibrinólisis sistémica.

Para distinguir entre estas situaciones, se debe realizar un tiempo de reptilase o Ancrod, medir la concentración de fibrinógeno y medir el nivel de PDF o dímeros-D en el plasma. El patrón puede también aparecer en la CID incipiente, pero habitualmente en este caso el recuento plaquetario también caerá.

6.

TP	**Normal**
TTPA	**Normal**
Tiempo de trombina	**Normal**
Fibrinógeno	**Normal**
Recuento plaquetario	**Bajo**

Si la única alteración es un recuento plaquetario bajo, deben investigarse las posibles causas. Deben buscarse recuentos previos para establecer si la trombocitopenia es de larga duración o posiblemente constitucional. Cuando parece ser un proceso adquirido, el enfoque habitual es realizar un aspirado de médula ósea para excluir el fracaso de la médula ósea y establecer si hay megacariocitos. Si el número y la morfología de los megacariocitos en la médula ósea es normal, se llevan a cabo nuevas investigaciones para establecer la presumible causa de la destrucción periférica de plaquetas. La heparina y otros fármacos son causas frecuentes en la práctica hospitalaria.

7.

TP	**Alargado**
TTPA	**Alargado**

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tiempo de trombina	**Normal**
Fibrinógeno	**Normal/anormal**
Recuento plaquetario	**Bajo**

Este patrón de alteraciones de las pruebas de cribado se halla en las siguientes situaciones:

1. Después de una transfusión masiva con sangre almacenada/plasma que es deficitario en factores de coagulación.
2. En algunos casos de enfermedad hepática crónica, especialmente cirrosis.
3. En la CID. Aunque la activación de una coagulación diseminada finalmente acabará con la depleción de fibrinógeno, éste es un acontecimiento relativamente tardío.

Las determinaciones específicas de factores pueden ser útiles si la situación persiste. Debe considerarse la posibilidad de que un recuento plaquetario bajo tenga una etiología independiente y que la situación sea en realidad la misma que en la situación 4.

8.

TP	**Alargado**
TTPA	**Alargado**
Tiempo de trombina	**Alargado**
Fibrinógeno	**Bajo**
Recuento plaquetario	**Bajo**

Todas las pruebas de primera línea son anormales en las siguientes situaciones:

1. CID aguda.
2. Algunos casos de necrosis hepática aguda con CID.

Sólo excepcionalmente es necesario confirmar el diagnóstico de CID con pruebas adicionales (p. ej., estimando los PDF o la concentración del dímero-D o llevando a cabo pruebas de detección para la presencia de monómeros de fibrina). Considerar la posibilidad de que esté presente más de una causa.

Pruebas de corrección utilizando el TP o el TTPA

Principio

La prolongación inexplicada del TP o del TTPA puede investigarse con pruebas de corrección simples mezclando el plasma del paciente con plasma normal. La corrección indica un posible déficit de factor, mientras que si no se produce dicha corrección ello sugiere la presencia de un inhibidor, si bien la interpretación inicial debe ser cauta; véase más abajo.

Reactivos

Plasmas de corrección

El plasma normal contiene todos los factores de la coagulación; por consiguiente, las pruebas de mezcla con plasma normal identificarán la presencia de un inhibidor o de un déficit en un factor. En ediciones previas se describe la utilización de plasma envejecido y adsorbido, pero estos reactivos de corrección pueden arrojar resultados equívocos si no se usan con gran cuidado. Es mejor proceder directamente a realizar ensayos específicos de factores si se dispone de plasmas adecuados deficitarios en dicho factor.

PPP

Del paciente y de un control.

Otros reactivos. Véase página 344.

Método

Realizar una determinación de TP y/o TTPA en un plasma control, el plasma del paciente y una mezcla 50:50 de los plasmas control y del paciente (0,05 ml de cada uno). Llevar a cabo todas las pruebas por duplicado utilizando un orden equilibrado para evitar el sesgo temporal. Debe tenerse en cuenta que las pruebas de mezclas para detectar inhibidores del factor VIII pueden requerir la incubación durante 2 h (v. pág. 355).

Interpretación

Si la prolongación es resultado de un déficit en un factor de coagulación, el TP o el TTPA de la mezcla deben volver a la normalidad en un intervalo de pocos segundos. Después es necesario identificar el factor o factores específicos de los que existe un déficit.

Si el TTPA está alargado y el plasma no lo corrige, debe sospecharse la existencia de un inhibidor. Debe realizarse un cribado de inhibidores y pruebas para determinar un posible LAC.

Sin embargo, las pruebas de mezclas pueden generar resultados erróneos en dos circunstancias concretas:

1. Algunos inhibidores (habitualmente los anticuerpos anti-factor VIII) ejercen su acción de forma dependiente del tiempo, y la evaluación inmediatamente posterior a la mezcla puede mostrar una corrección falsa, mientras que tras 2 h de incubación revelará su efecto inhibitorio.
2. Algunos anticoagulantes tipo lupus son relativamente frágiles y pueden ser sólo aparentes si se utilizan mezclas 25:75 de plasma normal y plasma a evaluar. Para ver detalles sobre la evaluación de inhibidores, véase página 354.

Comentario

Algunas veces las pruebas de corrección no son tan categóricas como la bibliografía y la teoría sugerirían. La corrección incompleta puede ser difícil de interpretar. Si las pruebas de corrección caen dentro del «área gris», deben medirse niveles de factores específicos y se debe evaluar la presencia de un LAC, controlando la existencia del efecto dependiente del tiempo y la no linealidad.

Pruebas de corrección utilizando el tiempo de trombina

Principio

Estas pruebas utilizan ciertas propiedades fisicoquímicas de los reactivos para unirse a inhibidores o moléculas anormales y normalizar el TT prolongado. El sulfato de protamina tiene una carga neta electropositiva e interacciona con la heparina, y también se une a los PDF, neutralizando los efectos inhibitorios de ambos. El azul de toluidina también es un reactivo cargado eléctricamente que neutralizará la heparina pero no tiene efecto sobre los PDF. Es interesante saber que el azul de toluidina normaliza el TT en algunas disfibrinogenemias, probablemente interaccionando con el exceso de ácido siálico ligado a las moléculas de fibrinógeno. La mezcla con suero corregirá la prolongación del TT resultante de la hipoalbuminemia.

Reactivos

Plasma del paciente y del control

Sulfato de protamina
1% y 10% en NaCl en concentración de 9 g/l.

Azul de toluidina
0,05 g en 100 ml de NaCl en concentración de 9 g/l.

Trombina bovina
Como se describió en el apartado del tiempo de trombina.

Método

Realizar la prueba como se describió para la medición del TT, añadiendo 0,1 ml de solución salina a los controles y sustituyendo en el plasma prueba por sulfato de protamina o solución de azul de toluidina. Realizar también un TT en una mezcla 50:50 de plasma del paciente y de plasma control.

Interpretación

Véase tabla 16.4.

Comentario

En muestras con bajo contenido en fibrinógeno, el resultado final de la reacción puede ser difícil de observar en presencia de azul de toluidina debido al color oscuro del reactivo. Las concentraciones muy elevadas de fibrinógeno o la presencia de una paraproteína pueden causar una prolongación del tiempo que no se corrige ni con la protamina ni con el azul de toluidina. Diluir el plasma que se va a evaluar en solución salina acortará el TT.

Tiempo de reptilase o ancrod[27]

La reptilase, una enzima purificada de la serpiente *Bothrops atrox,* y el ancrod (Arvin), una enzima similar de la serpiente *Agkistrodon rhodostoma*, pueden utilizarse para sustituir a la trombina en la determinación del TT.

Los venenos se reconstituyen de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes, y la prueba se lleva a cabo exactamente como se describe para el TT. Los venenos de serpiente no son inhibidos por la heparina y darán tiempos normales para la coagulación del plasma normal en presencia de heparina. Los tiempos de coagulación, sin embargo, continuarán alargados en presencia de un aumento de PDF o niveles anormales o reducidos de fibrinógeno o hipoalbuminemia.

INVESTIGACIÓN DE TRASTORNOS HEMORRÁGICOS RESULTANTES DE UN DÉFICIT O DEFECTO DE UN FACTOR DE LA COAGULACIÓN

Cuando las pruebas de detección indican que un individuo presenta un defecto de coagulación, debe medirse la concentración plasmática de los factores de coagulación. Tales mediciones establecen el diagnóstico del déficit o defecto, y evalúan su gravedad; también pueden utilizarse para monitorizar el tratamiento sustitutivo y para detectar el estado de portador en familias en las cuales uno o más miembros están afectados por un trastorno hemorrágico congénito. Un individuo puede tener un déficit congénito de un factor de coagulación debido a una alteración de la síntesis o debido a la síntesis de una variante de la molécula que es deicitaria en su actividad coaguladora. En ambos casos, los resultados de los ensayos basados en pruebas de coagulación estarán por debajo de lo normal, pero cuando se produce una variante molecular, el resultado del ensayo inmunológico puede ser normal o casi normal.

Tabla 16.4. Interpretación de pruebas de corrección utilizando el tiempo de trombina (TT)

	TT del plasma problema corregido con			Interpretación
Solución salina	Plasma normal	Sulfato de protamina	Azul de toluidina	
No	Sí	No	No	Déficit
No	Var.	No	Sí	Disfibrinogenemia de la enfermedad hepática
No	Var.	Sí	No	Alta concentración de PDF

PDF, productos de degradación del fibrinógeno; Var., variable.
Es esencial excluir la posibilidad de la contaminación con heparina.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Principios generales de los bioensayos en línea paralela de los factores de coagulación

Si dos materiales que contienen el mismo factor de coagulación se ensayan en un sistema de determinación específico en un intervalo de diluciones, y los tiempos de coagulación se representan frente a la concentración del plasma en un papel para gráfico lineal, se obtienen representaciones de la curva dosis respuesta. Si el gráfico se vuelve a trazar sobre un papel doble logarítmico, se obtiene una curva sigmoide con un corte justo en el medio (v. fig. 16.8), aunque en algunos casos (p. ej., factor VIII) se requiere utilizar papel semilogarítmico. Si las diluciones de la prueba y de los materiales estándar se eligen cuidadosamente, debe ser posible dibujar dos líneas paralelas rectas. La distancia horizontal entre las dos líneas representa la diferencia en potencia («fuerza» o concentración) del factor analizado. Si la línea de la prueba queda a la derecha del estándar, contiene menos factor que el estándar; si está a la izquierda, contiene más. El ensayo se basa en la asunción de que tanto la muestra problema como el control se comportan como diluciones simples entre sí. Esta asunción ha causado algunos problemas cuando se evalúan muestras que contienen concentrados de factor VIII o IX (v. más abajo).

Cuando se plantea y se realiza un ensayo de líneas paralelas, deben tomarse ciertas medidas para asegurar que el ensayo sea válido y fiable.

1. *Intervalo de dilución*. Éste debe elegirse de forma que los tiempos de coagulación caigan en la porción lineal de la curva sigmoide. Por ejemplo, cuando se analiza el factor VIII:C para ensayos de una fase, las diluciones que arrojan tiempos entre 60 y 100 s se seleccionan si el tiempo de coagulación del control es mayor de 120 s. (El control consta de una mezcla de tampón y sustrato o plasma deficitario, que proporciona todos los factores excepto aquel que va a ser medido.)
2. *Número de diluciones*. Se ensayan al menos tres diluciones del estándar y de la prueba para generar la mejor solución gráfica o matemática.
3. *Respuestas*. Se deberían elegir diluciones de la muestra de prueba de forma que los tiempos de coagulación se encuentren dentro del intervalo obtenido para el estándar. Si resulta que el resultado de la prueba cae fuera de este intervalo, la curva estándar no debe extrapolarse pero las diluciones de la prueba y/o del estándar deben ajustarse.
4. *Duplicados y replicados*. Los duplicados se obtienen de la misma dilución de la muestra y algunas veces mediante el muestreo sucesivo de la misma mezcla de incubación. Los replicados son verdaderas repeticiones que implican una dilución fresca y reactivos frescos. Normalmente, los tiempos de coagulación se miden a partir de duplicados. Los replicados son a veces utilizados para ensayos especialmente difíciles.
5. *Arrastre temporal*. Éste ya se ha discutido. Los duplicados en un ensayo de coagulación deben ser siempre evaluados en un orden equilibrado (p. ej., ABCCBA).

Nota sobre determinaciones de factores de punto único

Los resultados de un ensayo de factores dependen de la obtención de líneas paralelas para los plasmas evaluado y de referencia. Muchos analizadores de coagulación automáticos darán un resultado de la determinación obtenido a partir de una única dilución suponiendo que se cumple esta

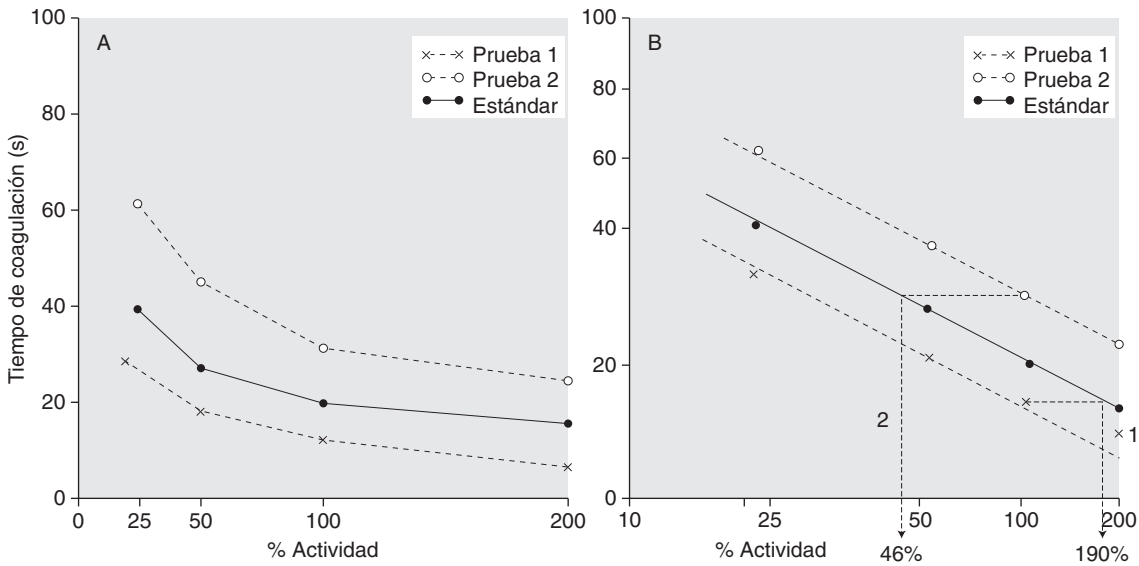


Figura 16.8. Bioensayo en línea paralela de factor VII. A: Tiempos de coagulación con diluciones 1 en 5, 1 en 10, 1 en 20 y 1 en 40 de plasma de prueba y estándar representados en el papel de gráfico lineal. B: Los mismos datos representados en papel logarítmico doble. Se obtienen tres líneas rectas paralelas. El cambio horizontal de la línea de prueba representa la diferencia en potencia. En este caso la prueba 1 tiene una potencia del 190% y la prueba 2 tiene una potencia del 46%. A la dilución 1 en 10 del plasma estándar se le asigna una potencia del 100%.

condición. Sin embargo, esto no es siempre cierto, y, si se sospecha la existencia de un inhibidor, los resultados de más de una dilución son necesarios para comparar y determinar el paralelismo. De forma análoga, si el resultado está por encima de la parte lineal de la curva estándar, deben evaluarse nuevas diluciones.

Ensayos basados en el tiempo de protrombina

La investigación de un alargamiento del TP aislado en un tiempo (p. ej., sospecha de déficit o defecto de factor VII) en un individuo con antecedentes personales de sangrado incluye una determinación en un tiempo del factor VII. Si se detecta una concentración baja de factor VII, nuevas pruebas pueden incluir inmunoensayos del factor VII y, cuando es posible, un estudio familiar.

Ensayo en un tiempo del factor VII

Principio

La determinación del factor VII se basa en el TP. La determinación compara la capacidad de las diluciones del plasma del paciente y de un plasma estándar para corregir el TP de un plasma sustrato. Es fácilmente adaptable para determinar la protrombina, el FV o el FX.

Reactivos

PPP del paciente

Plasma de referencia/estándar

Véase página 336.

Plasma deficitario en factor VII

Comercial o de un paciente con un déficit grave conocido.

Solución salina tamponada con barbital

Véase página 588.

Tromboplastina

Se recomienda que una tromboplastina humana recombinante se utilice para el análisis del FVII humano. Se ha utilizado una tromboplastina de cerebro de conejo que se sabe que es sensible al déficit de factor VII, pero existe el peligro de que diferencias entre las especies arrojen resultados erróneos. La tromboplastina debe reconstituirse de acuerdo con las instrucciones del fabricante y puede tener suficiente Ca para el ensayo. Calentar suficiente tromboplastina para el ensayo a 37 °C.

$CaCl_2$

De concentración 0,025 mol/l (si no se encuentra en la preparación de tromboplastina).

Método

Preparar diluciones 1 en 5, 1 en 10, 1 en 20 y 1 en 40 de los plasmas estándar y de prueba en solución salina tamponada. Transferir 0,1 ml de cada dilución a un tubo de cristal y añadir a 0,1 ml de plasma deficitario (sustrato). Mezclar y dejar que se caliente hasta 37 °C. Añadir 0,1 ml de tromboplastina diluida y poner en marcha el cronómetro. Registrar el tiempo de coagulación. Si la tromboplastina no contiene calcio, iniciar el cronómetro después de añadir 0,1 ml de $CaCl_2$. En cada ensayo debe incluirse un control, y todas las pruebas deben realizarse por duplicado y en orden equilibrado.

Cálculo de los resultados

Representar los tiempos de coagulación del plasma problema y del estándar frente a la concentración de factor VII en un papel gráfico log-log. Leer la concentración como se muestra en la figura 16.8.

Intervalo normal

El intervalo normal es 0,5-2,0 u/ml (para discusión de las unidades, v. pág. 354).

Interpretación

Los pacientes con déficit congénito tienen niveles de factor VII por debajo de 0,30 u/ml. La concentración medida puede variar de acuerdo con la tromboplastina utilizada en el ensayo, de forma que es preferible utilizar tromboplastina humana. Una pequeña proporción de pacientes tienen un antígeno factor VII normal a pesar de presentar una actividad funcional anormal.

Ensayos basados en el tiempo de tromboplastina parcial activada

Un ensayo basado en el TTPA (p. ej, de factor VIII) puede estar indicado después de haber corregido un TTPA prolongado mezclando el plasma problema con otro plasma. Se describe un ensayo para factor VIII, que también se adapta fácilmente al FIX, al FXI o al factor de contacto, utilizando el plasma deficitario en el factor que se va a analizar.

Ensayo en un tiempo del factor VIII:C[28,29]

Principio

El ensayo en un tiempo del factor VIII:C se basa en el TTPA de acuerdo con el principio de bioensayo descrito previamente.

Reactivos

PPP

Del paciente.

Plasma de referencia/estándar

Véase la página 336.

Plasma deficitario en factor VIII (plasma sustrato)

Si se utiliza un plasma comercial, el reactivo debe reconstituirse de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Si se utiliza el de un donante hemofílico, su concentración de factor VIII:C debe ser menor del 1% y su plasma debe es-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

tar libre de inhibidores. El plasma debe almacenarse en volúmenes adecuados (p. ej., 2 ml) a –20 °C o menos hasta ser utilizado. Todas las muestras de pacientes han de considerarse como potencialmente infecciosas. Las muestras de pacientes deben ser evaluadas para anticuerpos del virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH) y hepatitis C y antígeno de hepatitis B (HBs).

Solución salina tamponada con barbital
Véase la página 588.

Reactivos para TTPA

Tubos de plástico
Permitirán evitar la activación por contacto mientras se preparan las muestras.

Baño helado

Método
Colocar el reactivo de TTPA y el $CaCl_2$ a 37 °C, y los plasmas del paciente, el estándar y el sustrato en el baño helado hasta que se utilicen.

Hacer diluciones de una décima parte del plasma problema y del estándar en solución salina tamponada en tubos de plástico en el baño helado. Utilizando volúmenes de 0,2 ml, hacer diluciones dobles en solución salina tamponada para obtener diluciones a 1/20 y 1/40. Colocar 0,1 ml de las tres diluciones (1/10, 1/20 y 1/40) en tubos de cristal. Si se sospecha que el plasma que se va a evaluar tiene un contenido muy bajo en factor VIII:C, hacer diluciones 1/5, 1/10 y 1/20 del plasma que se evalúa.

Añadir a cada dilución 0,1 ml de plasma recién reconstituido o plasma sustrato descongelado y calentar a 37 °C. Realizar una determinación de TTPA de acuerdo con el protocolo del laboratorio siguiendo un orden equilibrado de duplicados.

Las diluciones deben evaluarse a intervalos de 2 min según el reloj principal. La determinación debe terminarse con un control que conste de 0,1 ml de solución salina tamponada y 0,1 ml de plasma sustrato.

Cálculo de los resultados
Debe representarse los tiempos de coagulación del problema y del estándar frente a la concentración de factor VIII:C en papel semilogarítmico. Leer la concentración como se muestra en la figura 16.8. Es importante obtener líneas rectas y paralelas si se desea un resultado exacto. Las razones del no paralelismo y curvatura son las siguientes:

1. Error técnico. Repetir el ensayo con diluciones frescas.
2. Activación del plasma por una mala recogida. Se debe recoger una nueva muestra.
3. Una baja concentración de factor VIII:C en el plasma problema da lugar a líneas no paralelas. Debe prepararse una mayor concentración de plasma y evaluarse.
4. La presencia de un inhibidor. Las pruebas descritas en la página 354 deben llevarse a cabo.

Algunos coagulómetros automáticos generan valores por cálculo utilizando fórmulas matemáticas. Si el plasma estándar se calibra en términos de unidades internaciones, el resultado puede expresarse como UI. Por ejemplo, si el plasma estándar tiene una concentración de factor VIII:C de 0,65 UI/ml y la prueba demuestra tener el 20% de la actividad del estándar, el plasma que se evalúa tendrá una concentración de factor VIII de 0,13 UI/ml (20% de 65 UI/ml).

Intervalo normal
El intervalo normal es 0,45-1,58 UI/ml. Cada laboratorio debe determinar su propio intervalo de normalidad.

Interpretación
Algunas personas clínicamente normales tienen concentraciones de factor VIII:C de 35-50 UI/dl. Valores por debajo de 30 UI/dl son inequívocamente anormales; valores por debajo de 50 UI/dl son significativos en portadores de hemofilia (heterocigotos).

En los siguientes casos, la concentración de factor VIII:C puede estar reducida:

1. Hemofilia A.
2. Algunos portadores de hemofilia A (heterocigotos).
3. EVW, tipos I y III y algunos casos de tipo II.
4. Déficit combinado congénito de factores VIII y V (raro).
5. Coagulación intravascular diseminada.
6. Hemofilia adquirida (anticuerpos anti-factor VIII).

El aumento de factor VIII ha demostrado asociarse a trombosis[30].

Otras pruebas en la hemofilia A
Debe excluirse la reducción en factor VIII secundaria a EVW. Se deben medir los FVW:Ag y FVW:Rco (descrito más adelante), y se debe investigar la historia familiar del paciente. Una concentración baja de factor VIII con FVW:Ag y FVW:Rco normales puede también ser resultado de la EVW tipo Normandía (Tipo 2N) que debe sospecharse cuando no hay una clara historia familiar o ligada al sexo, y que puede confirmarse mediante un ensayo de unión FVIII-FVW[31].

Ensayos cromogénicos y en dos tiempos del factor VIII
El ensayo en un tiempo de factor VIII es sensible a la preactivación de los factores de coagulación en la muestra del paciente. Los ensayos en dos tiempos y cromogénicos evitan este problema al preactivar todo el factor VIII presente, seguido de un análisis en un sistema caracterizado por su capacidad para generar Xa. En el ensayo cromogénico esto se mide utilizando un sustrato cromogénico Xa; en el ensayo en dos tiempos se mide mediante un indicador final de la coagulación. En general, estos métodos han demostrado ser demasiado engorrosos o caros para su uso generalizado y la preactivación rara vez es un problema significativo. Sin embargo, en casos de hemofilia leve se ha comunicado una discrepancia clínica significativa entre los dos tipos de ensayo.

En estos casos, las mutaciones que desestabilizan la interacción entre los dominios A_1 y A_2 generan un resultado en un ensayo en un tiempo que es superior al obtenido en el ensayo de dos tiempos. Lo que es más significativo, el problema clínico del paciente está más en consonancia con el resultado del ensayo de dos fases[32,33]. El ensayo cromogénico ha resultado también ser útil para evitar algunos de los problemas que aparecen con los ensayos con concentrados de factor VIII.

Pruebas necesarias para monitorizar el tratamiento sustitutivo en los déficits y alteraciones funcionales de los factores de la coagulación

El tratamiento sustitutivo requiere lo siguiente:

1. Cálculo de la dosis del material que se debe administrar y la frecuencia de dicha administración.
2. Evaluación de la respuesta a la dosis.
3. Monitorización de cualquier efecto adverso.

La *dosis* que se debe administrar se calcula a partir del peso corporal del paciente y del aumento en la concentración del plasma del factor de coagulación deficitario. Por tanto, debe conocerse la concentración plasmática del paciente y la potencia o fuerza del material terapéutico. Para la gran mayoría de pacientes en que se conoce el defecto y la concentración plasmática se ha medido, y para los que se utiliza un concentrado de factor congelado-seco comercial, esto implica un cálculo basado en la siguiente fórmula:

Para el factor VIII la dosis en UI/kg de peso corporal = incremento requerido en UI/dl dividido por 1,5
Para el factor IX derivado del plasma, la dosis en UI/kg de peso corporal = incremento requerido en UI/dl
Para el factor IX recombinante, la dosis en UI/kg de peso corporal = incremento requerido en UI/dl dividido por 0,8

El incremento requerido depende del tipo de sangrado, la semivida y la estabilidad del factor de coagulación utilizado, y la concentración del factor deficitario en el plasma del paciente previamente al tratamiento.

La evaluación de la respuesta al tratamiento requiere mediciones regulares de la concentración en el plasma del factor de coagulación determinado mediante un ensayo funcional. La respuesta puede evaluarse a partir de la siguiente fórmula:

Aumento en UI/dl dividido por la dosis en UI/kg de peso corporal = K, que es aproximadamente 2 en la hemofilia A y aproximadamente 1 en la hemofilia B (si se utilizan concentrados plasmáticos)

La respuesta suele evaluarse justo después de la administración del material terapéutico. Una respuesta inadecuada puede deberse a un error en el cálculo de la dosis, a que la potencia del material terapéutico sea menor de la esperada o a que el paciente esté desarrollando un inhibidor.

Los principales *efectos adversos* son la transmisión de una infección y el desarrollo de inhibidores. Si se sospecha la presencia de un inhibidor, debe confirmarse utilizando las pruebas descritas en la página 354 y evaluarse de forma cuantitativa. La monitorización de la reposición y otros tipos de tratamientos en pacientes con inhibidores fueron descritos por White y Roberts[34].

Las estimaciones de factor VIII en pacientes con hemofilia tratados con concentrados de factor VIII suelen dar resultados discrepantes. Esto se debe fundamentalmente a que el concentrado de factor VIII (diluido en plasma hemofílico) se compara con un plasma estándar. En general, en esta situación los ensayos en dos tiempos o los cromogénicos revelan una mayor concentración que los ensayos en un tiempo. Esto se ha reseñado especialmente en pacientes que han sido tratados con factor VIII sin dominio B (Refacto, Wyeth Pharmaceuticals). En este caso se cuenta con una preparación de referencia específica del producto. Se recomienda que se use en conjunción con un ensayo cromogénico, aunque puede no ser necesario[35]. En la mayoría de otros casos la experiencia clínica de utilizar los resultados de ensayos en un tiempo continúa siendo válida.

Los análisis de concentrados de factor VIII están plagados de dificultades, y una discusión detallada se encuentra fuera del objetivo de este capítulo[36]. Las dificultades surgen de diversos problemas. En primer lugar, la potencia del concentrado puede asignarse utilizando un ensayo en un tiempo (como en los Estados Unidos) o un ensayo cromogénico (como en Europa). En segundo lugar, muchos concentrados, incluso cuando se diluyen en plasma hemofílico, se comportan de forma diferente en los ensayos en un tiempo y en los ensayos cromogénicos. Como resultado hay estándares por separado de la OMS para la determinación de FVIII: un plasma para la determinación de FVIII en muestras de plasma y un concentrado para determinación de FVIII en concentrados. Esto se basa en el principio de ensayar datos congruentes, aunque hay tantos concentrados diferentes con características diferentes que el objetivo, es difícil de conseguir y todos deben finalmente calibrarse frente a un conjunto único de plasmas[37].

Investigación de un paciente cuyos TTPA y TP están alargados

Un TP y un TTPA alargados pero con TP normal pueden ser el resultado de un defecto o de un déficit de uno de los factores de la vía común: factor X, factor V o protrombina. Además, el paciente podría estar sufriendo un déficit combinado mucho menos frecuente como es el de factores V y VIII:C. La enfermedad hepática y el déficit de vitamina K deben excluirse siempre, incluso en presencia de una historia familiar de hemorragias. Las pruebas mixtas ilustradas en la página 354 pueden ayudar a situar el defecto; el factor o factores perdidos deben estimarse cuantitativamente. El factor X, el factor V y la protrombina pueden todos ensayarse de forma satisfactoria utilizando un ensayo basado en la protrombina como se describe para el fac-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

tor VII. El ensayo con veneno Taipan para protrombina y el ensayo con veneno de la víbora de Russell para el factor X se describen en la octava edición de esta obra.

INVESTIGACIÓN DE UN PACIENTE CON UN ANTICOAGULANTE CIRCULANTE (INHIBIDOR)[38]

Los anticoagulantes circulantes o los inhibidores adquiridos de los factores de la coagulación son inmunoglobulinas que surgen bien en individuos con déficits congénitos, como resultado de la administración del factor deficitario, bien en sujetos con hemostasias normales previas, como parte de un proceso autoinmune. Habitualmente, se sospecha un inhibidor cuando un alargamiento en una prueba de coagulación no se corrige después de mezclar 50:50 con plasma normal o si un déficit aparente en un factor no concuerda con la historia clínica del paciente.

El anticoagulante más frecuente en personas con hemostasia normal es el LAC, pero a pesar de la prolongación de las pruebas de coagulación *in vitro*, este anticoagulante en realidad predispone a la trombosis, y su diagnóstico e investigación se consideran por tanto en la página 380. De los anticoagulantes que causan una diátesis hemorrágica, los anticuerpos contra el factor VIII:C son los más frecuentes. Se encuentran en el 15% o más de los hemofílicos pero también aparecen como autoanticuerpos en individuos previamente normales. Éstos pueden pertenecer a dos categorías generales: aquellos con cinética simple y aquellos con cinética compleja. Los pacientes con hemofilia habitualmente desarrollan anticuerpos con cinética simple; este inhibidor reacciona con el factor VIII:C de forma lineal y el complejo antígeno/anticuerpo no presenta actividad factor VIII:C. Los anticuerpos en individuos no hemofílicos o en pacientes con hemofilia leve/moderada habitualmente desarrollan anticuerpos con cinética compleja: la inactivación del factor VIII:C es al principio rápida, pero a continuación se enlentece conforme el complejo antígeno/anticuerpo se disocia o presenta cierta actividad factor VIII:C. La adición de más factor VIII conduce a la misma actividad residual (de equilibrio) del factor VIII.

Los inhibidores dirigidos contra otros factores de coagulación son muy raros, pero en los últimos años ha sido cada vez más diagnosticada una forma adquirida de EVW que suele asociarse con una paraproteína. La hipoprotrombinemia debida a autoanticuerpos es una complicación infrecuente del lupus eritematoso sistémico[39]. En esta sección sólo se describen en detalle los ensayos para detectar un inhibidor del factor VIII:C.

Si se ensayan diferentes factores de coagulación puede surgir confusión por la presencia del inhibidor. Por ejemplo, si el plasma de un paciente contiene un inhibidor dirigido contra el factor VIII y se evalúa la concentración de factor IX en ese plasma utilizando plasma deficitario en factor IX, los tiempos de coagulación en el ensayo del factor IX estarán prolongados. Esto puede conducir a la conclusión errónea de que el paciente tiene un déficit de factor IX, especialmente si se utiliza la dilución simple del plasma problema. Los factores de coagulación deben siempre ensayarse en múltiples diluciones. Si el inhibidor está específicamente dirigido contra un factor de coagulación, ese factor demostrará ser igualmente deficitario en todas las diluciones del plasma del paciente. El nivel ensayado de otros factores de coagulación aumentará con la dilución creciente, conforme el inhibidor se encuentra más diluido.

Detección de un inhibidor circulante (anticoagulante) basado en el TTPA[38]

Principio

Los anticoagulantes o inhibidores circulantes que afectan al TTPA pueden actuar inmediatamente o ser dependientes del tiempo. El plasma normal mezclado con un plasma que contiene un inhibidor de acción inmediata tendrá poco o ningún efecto sobre el tiempo de coagulación prolongado. Por el contrario, si un plasma normal se añade al plasma que contiene un inhibidor dependiente del tiempo, el tiempo de coagulación del último se verá sustancialmente acortado. Sin embargo, después de 1-2 h, la corrección también desaparecerá, y el tiempo de coagulación volverá a alargarse. Para detectar ambos tipos de inhibición, las muestras de plasma normal y problema se analizan inmediatamente después de mezclarse y también después de la incubación conjunta a 37 °C durante 120 min.

Reactivos

Plasma normal

Plasma normal liofilizado comercialmente o un conjunto de plasmas de 20 donantes como se describe en la página 337.

PPP

Del paciente.

Reactivos del TTPA

Véase la página 341.

Método

Preparar tres tubos de plástico como sigue: colocar 0,5 ml de plasma normal en un primer tubo, 0,5 ml del plasma del paciente en un segundo tubo, y una mezcla de 0,25 ml de plasma normal y 0,25 ml de plasma del paciente en un tercer tubo. Incubar los tubos durante 120 min a 37 °C y a continuación colocar los 3 tubos en un baño helado o sobre hielo picado. A continuación, hacer una mezcla 50:50 de los contenidos de los tubos 1 y 2 en un cuarto tubo, lo que sirve para evaluar la presencia de un inhibidor inmediato. Realizar un TTPA por duplicado en los cuatro tubos.

Resultados e interpretación

Véase la tabla 16.5. Nótese que el período de incubación produce una prolongación del TTPA del plasma normal.

Tabla 16.5. Interpretación de la detección de inhibidor basada en el tiempo de tromboplastina parcial activada

Tubo	Contenido	Tiempo de coagulación		
1	Plasma normal	Normal	Normal	Normal
2	Plasma del paciente	Alargado	Alargado	Alargado
3	Mezcla 50:50 paciente: normal; incubado 2 h	Normal	Alargado	Alargado
4	Mezcla 50:50 paciente: normal; no incubación	Normal	Alargado	Normal
Interpretación		Déficit	Inhibidor de actuación inmediata	Inhibidor dependiente del tiempo

Medición cuantitativa de los inhibidores del factor VIII:C

Principio

Los inhibidores del factor VIII suelen ser dependientes del tiempo[38]. Por tanto, si se añade factor VIII:C al plasma que contiene un inhibidor y se incuba la mezcla, el factor VIII:C será progresivamente neutralizado. Si la cantidad de factor VIII:C añadido y la duración de la incubación están estandarizadas, la intensidad de la inhibición puede determinarse en unidades de acuerdo con la cantidad de factor VIII:C que se destruye.

En el método Bethesda, la unidad se define como la cantidad de inhibidor que neutralizará el 50% de una unidad de factor VIII:C en plasma normal después de 2 h de incubación a 37 °C.

Las diluciones del plasma problema se incuban con un volumen igual de un conjunto de plasmas normales a 37 °C. El conjunto de plasmas normales se considera que representa una unidad de factor VIII:C. Las diluciones de un plasma control normal que no contienen inhibidor se tratan de la misma forma. Un volumen igual de plasma normal mezclado con tampón se considera que representa el valor 100%.

Al final del período de incubación se cuantifica el factor VIII:C residual y la potencia del inhibidor se calcula a partir de un gráfico estándar de la actividad del factor VIII:C residual frente a las unidades de inhibidor.

Modificaciones del ensayo de inhibidor

El ensayo de Bethesda y la modificación de Nijmegen dan resultados similares con niveles altos de inhibición de factor VIII. Sin embargo, a niveles bajos (por debajo de 1,0) el método de Bethesda puede dar niveles de inhibición falsamente positivos, mientras que el método Nijmegen daría niveles cero de inhibición. Varios artículos han demostrado que los cambios en el pH y en las concentraciones de proteínas conducirán a cambios en la estabilidad del factor VIII y en la inactivación. La inactivación del factor VIII se incrementa con el pH, y la reducción de la concentración de proteínas conduce a una ulterior inactivación de la actividad del factor VIII. La modificación de Nijmegen previene estas discrepancias tamponando el plasma normal con tampón imidazol 0,1 M a pH 7,4 y utilizando plasma inmunodeplecionado deficitario en factor VIII en la mezcla control[40]. El ensayo puede también modificarse para utilizar concentrado de factor VIII (método Oxford) o incrementando el tiempo de incubación a 4 h (nuevo método Oxford).

Reactivos

Tampón de glioxalina

Véase la página 341.

Caolín

Se utiliza caolín a una concentración de 5 mg/ml y sustituto de plaquetas. Fosfolípidos o reactivo TTPA preferido.

Plasma deficitario en factor VIII:C

Plasma estándar

Reserva de plasmas normales.

Método

Pipetear en cada uno de los tubos de plástico de una serie 0,2 ml del conjunto de plasmas normales. Añadir 0,2 ml de tampón de glioxalina al primer tubo (este tubo sirve como valor 100%); añadir 0,2 ml de diluciones de plasma de prueba en tampón de glioxalina a cada uno de los otros tubos. Si el inhibidor del paciente ha sido ensayado previamente, éste puede utilizarse como una guía para las diluciones que deben utilizarse. Si el paciente no ha sido estudiado con anterioridad, debe establecerse un rango de diluciones a partir de plasma no diluido hasta una dilución de 1/50.

Tapar, mezclar e incubar todos los tubos durante 2 h a 37 °C. A continuación, sumergir todos los tubos en un baño helado. Realizar ensayos de factor VIII:C en todas las mezclas de incubación.

Cálculo de resultados

Registrar el porcentaje residual de factor VIII:C para cada mezcla asumiendo que el valor ensayo del control es el 100%. Se selecciona la dilución del plasma problema que da el porcentaje de factor VIII:C residual más cercano al

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 16.6. Ejemplo del cálculo de unidades Bethesda (u) en tres muestras de plasma

Paciente	Dilución plasmática	% residual VIII:C	Cálculo u × dilución	Inhibidor en u de Bethesda
A	No diluido	61	0,70 × 1	= 0,07
B	1 en 5	33	1,60 × 5	= 8,0
	1 en 10	55	0,85 × 10	= 8,5
	1 en 15	68	0,55 × 15	= 8,3
C	1 en 5	40	1,30 × 5	= 6,5
	1 en 10	55	0,85 × 10	= 8,5
	1 en 15	61	0,70 × 15	= 10,5
	1 en 20	65	0,60 × 20	= 12

El paciente A tiene un inhibidor leve; el paciente B, un inhibidor con cinética simple, y el paciente C, un inhibidor con cinética compleja. Todos los valores se han elegido para una actividad porcentual residual de factor VIII:C cercana al 50%. Las unidades para el cálculo se leen a partir de la figura 16.9 utilizando el % de factor residual VIII:C. (Adaptado de Kasper CK, Ewing NP. 1982 The haemophilias: measurement of inhibitor to factor VIII C (and IX C). Métodos en hematología 5:39.)
Nótese que en los pacientes B y C los resultados deben comunicarse como 8,5 unidades Bethesda; en C, el nivel calculado de inhibidor puede continuar creciendo con el incremento de la dilución.

50% (entre el 30 y el 60%) para calcular la fuerza del inhibidor. Los resultados se calculan como se muestra en la tabla 16.6 y en la figura 16.9 para tres pacientes diferentes con un inhibidor leve sólo detectado en plasma no diluido, un inhibidor más potente con cinética simple y un inhibidor con cinética compleja, respectivamente.

Interpretación

Si la actividad residual del factor VIII:C está entre el 80 y el 100%, la muestra de plasma no contiene un inhibidor. Si la actividad residual es menor del 60%, el plasma contiene de forma inequívoca un inhibidor. Valores entre el 60 y el 80% son limítrofes, y es necesaria una evaluación repetida sobre muestras adicionales antes de que se pueda establecer el diagnóstico.

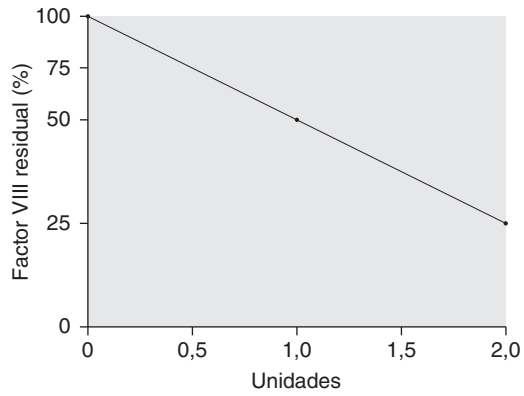


Figura 16.9. Determinación de inhibidores de factor VIII:C. La relación entre la actividad residual del factor VIII:C en plasma normal y la actividad de inhibidor en el plasma que se va a evaluar puede leerse a partir de este gráfico. A una inhibición del 50% el plasma problema contiene, por definición, 1 unidad de inhibidor Bethesda por mililitro. Nótese que el eje «y» está en escala logarítmica. Véase también la tabla 16.7.

Pruebas para otros inhibidores

Los inhibidores del factor IX pueden medirse en un sistema idéntico al descrito previamente. Debido a que los inhibidores del factor IX actúan inmediatamente, no hay necesidad de una incubación prolongada; las mezclas pueden analizarse después de 5 min a 37 °C. La actividad del inhibidor frente al factor VIII porcino puede ser medida sustituyendo el Hyate C (factor VIII porcino, concentrado, apropiadamente diluido en plasma deficitario en factor VIII) por plasma normal.

INVESTIGACIÓN DE UN PACIENTE CON SOSPECHA DE AFIBRINOGENEMIA, HIPOFIBRINOGENEMIA O DISFIBRINOGENEMIA

Un paciente que se sospecha que presenta afibrinogenemia, hipofibrinogenemia o disfibrinogenemia suele presentar un TTPA, un TP y un TT prolongados. La prolongación del TP es habitualmente menos marcada que la del TTPA y del TT. Puede existir bien una historia de sangrado, bien de acontecimientos trombóticos recurrentes, y muchos pacientes (alrededor del 50%) son asintomáticos. Es importante que se realice una estimación física del fibrinógeno (como el peso del coágulo) así como un ensayo basado en su función (p. ej., Clauss).

Estimación del fibrinógeno (peso del coágulo seco)

Principio

El fibrinógeno en plasma se convierte en fibrina mediante la coagulación con trombina y calcio. El coágulo resul-

tante se pesa. El coágulo resultante puede contener otras proteínas distintas incluyendo algunos PDF. Sin embargo, dicha determinación es más sencilla que el método de proteínas coagulables totales utilizado para el estándar internacional[41] y proporciona una comparación útil para la prueba de Clauss.

Reactivos

Plasma pobre en plaquetas (PPP)

$CaCl_2$
Se utiliza con una concentración 0,025 mol/l.

Trombina bovina
50 NIH U/ml.

Método
Pipetear 1 ml de plasma en un tubo de cristal de 12 × 75 mm y calentar a 37 °C. Colocar un aplicador de madera o una varilla de hisopo en el tubo; añadir 0,1 ml de $CaCl_2$ y 0,9 ml de trombina y mezclar. Incubar durante 15 min a 37 °C.

Agitar el coágulo de fibrina con la varilla, exprimiendo el suero. Lavar el coágulo en un tubo que contenga inicialmente 9 g/l de NaCl, y después agua. Secar el coágulo cuidadosamente con papel de filtro, eliminar la fibrina de la varilla y poner en acetona durante 5-10 min. Secar el coágulo en una campana de aire caliente o con una lámpara caliente durante 30 min. Dejar que se enfríe y a continuación pesarlo.

Resultados
El nivel de fibrinógeno se expresa en g/l (es decir, el peso de la fibrina obtenida a partir de 1 ml de plasma × 1.000).

Intervalo normal
El intervalo normal es de 1,5-4,0 g/l.

Estudios posteriores
Siempre que se sospeche una alteración congénita del fibrinógeno, debe excluirse la CID y la hiperfibrinólisis; no deben objetivarse PDF en exceso y no debe haber pruebas de consumo de otros factores de la coagulación y plaquetas (v. pág. 371). El siguiente paso del estudio es la determinación inmunológica o química de fibrinógeno. En las disfibrinogenemias la concentración de fibrinógeno suele ser normal o incluso estar elevada utilizando estos métodos, aunque los ensayos funcionales indiquen un déficit. Otras pruebas que pueden ser útiles son el tiempo de reptilase, la liberación de fibrinopéptidos, la estabilización con factor XIII, las pruebas de polimerización, la unión a la trombina y la lisis por plasmina. En algunos casos pueden realizarse análisis de ADN genómico[42]. A veces, la evaluación de los padres o de otros miembros de la familia es un medio útil para establecer si existe una alteración hereditaria del fibrinógeno.

DEFECTOS DE LA HEMOSTASIA PRIMARIA

Investigación de los trastornos vasculares de la hemostasia

Los trastornos vasculares de la hemostasia son aquellos que se derivan de un defecto o déficit en la pared del vaso. Esto puede ser resultado de un trastorno heredado del colágeno o de un trastorno adquirido como la amiloidosis o el escorbuto.

En general, las pruebas de coagulación disponibles en laboratorio serán de poca ayuda para elucidar tales defectos. La única prueba de cierta utilidad es el tiempo de sangría. Las pruebas de resistencia capilar son de escaso valor. Una historia clínica y una exploración física cuidadosa es más probable que proporcionen la base del diagnóstico. Debe prestarse especial atención a cicatrices previas, signos asociados de síndromes genéticos y evidencia de enfermedad sistémica. En algunos casos una biopsia tisular puede ser útil, pero la confirmación del diagnóstico requiere un análisis del colágeno a partir de fibroblastos cultivados o análisis de ADN de los genes candidatos relevantes[43].

Tiempo de sangría

Principio
Se realiza una incisión estándar en la región anterior del antebrazo y se determina el tiempo durante el que el corte sangra. La interrupción del sangrado indica la formación de tapones hemostáticos, que a su vez dependen de un número adecuado de plaquetas y de la capacidad de las plaquetas para adherirse al subendotelio y formar agregados[44].

Método estandarizado con dispositivo comercial[45]

Materiales

Esfigmomanómetro
Torundas de limpieza.

Dispositivo plantilla para tiempo de sangría
Como el «Simplate R» con una cuchilla retráctil única (Organon Teknika).

Papel de filtro
De un grosor de 1 mm.

Cronómetro

Método
Colocar un manguito de esfigmomanómetro alrededor del brazo del paciente por encima del codo, inflar hasta 40 mm Hg, y mantener a esta presión a lo largo de la prueba. Limpiar el área con etanol al 70% y dejar secar. Elegir un área de piel sobre la superficie anterior del antebrazo que esté libre de venas superficiales visibles. Utilizar un dispositivo comercial para hacer una o dos incisiones lon-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

gitudinales estándar. Si no se dispone del dispositivo, colocar una guía estéril de metal aplicada firmemente sobre la piel y alineada con respecto al eje longitudinal del brazo para realizar un corte de 7-8 mm de longitud mediante una cuchilla de escalpelo con tope de forma que la punta de la cuchilla protruya 1 mm a través de la plantilla para el corte. De esta forma se realiza una incisión de 6 mm de longitud y 1 mm de profundidad. Se dispone de modificaciones de la plantilla y de la cuchilla para realizar dos cortes simultáneos con un mecanismo de muelle.

Con el borde de un papel de filtro, a intervalos de 15 s secar la sangre que mana del corte. Evitar el contacto con la herida durante este procedimiento porque podría alterar la formación del tapón plaquetario. Cuando el sangrado se haya detenido, aproximar de forma cuidadosa los bordes de la incisión y aplicar una cinta adhesiva para reducir el riesgo de formación de queloides y una cicatriz antiestética.

Intervalo normal

El intervalo normal es 2-7 min. Se ha comunicado un límite superior de 4 min en un estudio realizado en hombres y mujeres que no habían tomado aspirina u otros fármacos relevantes en los diez días previos a la prueba[46a]. Idealmente, cada laboratorio debe determinar su propio intervalo normal y si es posible asegurar que la prueba sea llevada a cabo por el mismo técnico.

Método de Ivy[46]

El método de Ivy es similar al método del dispositivo, pero en vez de realizarse una incisión estandarizada, se realizan dos punciones separadas, con una distancia entre sí de unos 5-10 cm, utilizando una lanceta desechable. Cualquier microlanceta con una profundidad de corte de 2,5 mm y una anchura de poco más de 1 mm es válida; puede insertarse hasta su máximo de profundidad sin miedo a penetrar demasiado profundamente. Una fuente de imprecisión con el método de Ivy es la tendencia de la herida por punción a cerrarse antes de que se haya interrumpido el sangrado.

Intervalo normal

El intervalo normal es de 2-7 min. Idealmente, cada laboratorio debe determinar su propio intervalo normal y, si es posible, asegurar que la prueba sea llevada a cabo por el mismo técnico.

Interpretación de los resultados

Un tiempo de sangría prolongado puede ser resultado de los siguientes procesos:

1. *Trombocitopenia*. Es recomendable evaluar el recuento plaquetario antes de llevar a cabo una prueba de tiempo de sangría. Los pacientes con un recuento plaquetario por debajo de 50×10^9/l pueden tener un tiempo de sangría muy alargado y el sangrado puede ser difícil de frenar.
2. *Trastornos de la función plaquetaria*. Pueden ser congénitos, como en la trombastenia, enfermedades de depósito y similares (v. más adelante), o adquiridos, como el consumo de drogas, la uremia, la presencia de paraproteínas o los síndromes mielodisplásicos/mieloproliferativos.
3. *EVW*. Producirá como resultado una alteración de la adhesividad plaquetaria al subendotelio en ausencia de una cantidad normal o de un funcionamiento normal del FVW.
4. *Alteraciones vasculares*. Ejemplos de estas alteraciones se pueden encontrar en el síndrome de Ehler-Danlos o en el seudoxantoma elástico.
5. *Ocasionalmente, déficit grave de factor V u XI o afibrinogenemia*.
6. *El tiempo de sangría está sujeto a un gran número de variables y factores de confusión*. Es importante estandarizar la presión del esfigmomanómetro, la orientación longitudinal de la incisión, la región anterior del brazo y la manera de secar la sangre. Intentar repetir la prueba dentro de un corto período de tiempo suele dar un tiempo de sangría más acortado. Un tiempo de sangría normal no implica una hemostasia normal, y el resultado de la prueba ha demostrado no correlacionarse con el sangrado en otros puntos.

Pruebas de laboratorio de la función plaquetaria-factor Von Willebrand

Sistema PFA-100

La prueba de detección más ampliamente utilizada en los trastornos plaquetarios, el tiempo de sangría, adolece de una significativa variabilidad inherente a la prueba y no se correlaciona bien con la incidencia de hemorragias clínicamente significativas.

Actualmente se dispone de un sistema *in vitro* para realizar la medición de la función plaquetaria-FVW denominado PFA-100 (Dade Behring). El instrumento aspira una muestra de sangre bajo vacío constante a partir del reservorio de la muestra, a través de un capilar y de un corte de apertura microscópico en una membrana. La membrana está revestida de colágeno y/o bien adrenalina o adenosina 5´-difosfato (ADP). Por tanto se trata de un intento de reproducir altas tasas de disociación de la unión del FVW, el anclaje plaquetario, la activación y agregación, que lentamente constituyen un tapón plaquetario estable en el lugar de la apertura. El tiempo requerido para obtener una oclusión completa de la apertura se comunica como «tiempo de obturación». El cartucho primario contiene colágeno/adrenalina y el cartucho de colágeno/ADP se utiliza para identificar el posible uso de aspirina.

Los estudios han demostrado que este sistema es sensible a las alteraciones en la adhesividad y en la agregación plaquetaria, y es dependiente de niveles normales de FVW, glucoproteína Ib y glucoproteína IIb/IIIa pero no de los del fibrinógeno plasmático ni de la generación de fibrina.

El sistema PFA-100 puede reflejar la función plaquetaria del FVW mejor que el tiempo de sangría, pero no es sensible a los trastornos del colágeno-vasculopatías[47,48]. Los estudios han demostrado que muchos pacientes con trastor-

nos plaquetarios menores, como los defectos de secreción, no son detectados por el PFA-100[49].

INVESTIGACIÓN DE LA SOSPECHA DE ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND[50,52]

Un diagnóstico de EVW debe considerarse en los individuos con una historia relevante personal o familiar de hemorragias, en especial de tipo mucoso. Aunque una prolongación en el tiempo de sangría y en el TTPA en las pruebas de cribado ya resulta sugestiva, estas pruebas son normales en muchos pacientes con EVW, por lo que se deben llevar a cabo ensayos específicos. El cribado preliminar con una prueba como el PFA-100 puede ser útil para excluir los casos frontera. Deben estudiarse todas las formas de actividad coaguladora relevantes (p. ej., concentración de factor VIII:C, concentración FVW:Ag, actividad de unión de colágeno [FVW:CB] y actividad de cofactor ristocetina [FVW:Rco]). Cuando se interpretan los resultados, debe tenerse en cuenta el muy amplio intervalo de niveles de FVW en la población normal y el efecto del grupo sanguíneo ABO. Es obvio que muchos individuos con niveles por debajo del 30% del normal no tienen una tendencia hemorrágica significativa y se debe tener cautela al diagnosticar una EVW únicamente basándose en unos niveles de FVW moderadamente bajos[50-53].

Si se detecta una alteración, debe realizarse un análisis de los multímeros en plasma. En el plasma normal, cada multímero de FVW (una molécula grande que consta de entre 4 y más de 20 subunidades de FVW) se considera compuesto de un «triplete», es decir, una banda central oscura con una banda más clara por encima y otra por debajo; predominan los multímeros de alto peso molecular. En la EVW, el análisis de los multímeros puede ser aparentemente normal, puede no existir FVW:Ag detectable, pueden no estar presentes las formas de alto peso molecular necesarias para la adherencia plaquetaria normal, o el patrón de tripletes puede ser anormal. A partir de estos resultados puede clasificarse la EVW como se muestra en la tabla 16.7[50,52].

Ensayo de inmunoabsorción enzimática para el antígeno del factor Von Willebrand[54]

Principio

El ELISA consiste en recubrir una placa especial de microtitulación con un anticuerpo primario contra el FVW:Ag[54]. Una dilución adecuada del plasma problema se añade a los pocillos, permitiendo que el FVW:Ag se una al anticuerpo primario. Después de eliminar el exceso de antígeno lavando la placa, se añade un segundo anticuerpo, conjugado a una enzima, habitualmente peroxidasa, y llamado anticuerpo «marcador», que se unirá al FVW:Ag ya fijado a la plataforma. Con la adición de un sustrato específico, tiene lugar un cambio de color. Una vez la reacción se ha detenido con ácido, la densidad óptica (DO) de cada pocillo puede medirse mediante un lector electrónico de la placa; la DO es directamente proporcional a la cantidad de FVW:Ag presente en el plasma problema.

El anticuerpo primario puede sustituirse por un anticuerpo monoclonal específicamente dirigido contra la glucoproteína Ib del sitio de unión del FVW (comercializado por Porton, Cambridge). Se ha demostrado que esta modificación se correlaciona con la actividad funcional del FVW medido como actividad del cofactor de ristocetina (FVW:Rco). Sin embargo, debido a que se ha identificado un buen número de excepciones a esta relación, el ensayo de cofactor de ristocetina continúa siendo el patrón oro para estimar la actividad funcional del FVW.

Reactivos

Tampón de carbonato 0,05 M

1,59 g de Na_2CO_3, 2,93 g de $NaHCO_3$, 0,2 g de NaN_3 en 1 l de agua destilada (pH 9,6).

Tabla 16.7. Clasificación de la enfermedad de Von Willebrand

Tipo	Herencia	VIII:C	FVW:Ag	RiCoF	Análisis de multímeros	Comentarios
1	Autos. dominante	B/N	B	B	Patrón normal	–
2A	Autos. dominante	B/N	B/N	B	Ausentes multímeros de tamaño grande e intermedio, algunas formas tienen tripletes anormales	–
2B	Autos. dominante	B/N	B	B/N	Multímeros grandes ausentes Tripletes normales	Agregación con dosis bajas de ristocetina en plasma rico en plaquetas Trombocitopenia
2M	Autos. dominante	N	N	B	Patrón normal	–
2N	Autos. recesivo	B	N	N	Patrón normal	Unión FVIII anormal
3	Autos. recesivo	B	B	B	Virtualmente ausente	–

Autos., autosómico; B, baja; FVW, factor de Von Willebrand; N, normal; RiCoF, cofactor de ristocetina.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Solución salina tamponada con fosfato 0,01 M
0,39 g de NaH_2PO_4. $2H_20$, 2,68 g de $Na_2HPO_4.12H_2O$, 8,47 g de NaCl en 1 l de agua destilada (pH 7,2).

Tampón citrato fosfato 0,1 M
8,8 g de ácido cítrico, 24,0 g de $Na_2HPO_4.12H_2O$ en 1 l de agua destilada (pH 5,0).

Antisuero anti-FVW:Ag
Anti-FVW:Ag conjugado con peroxidasa
Plasma de calibración (100%) pobre en plaquetas
PPP (pruebas y control)
1,2-o-dihidrocloruro de fenilenediamina (ortofenilenediamina, OPD)
Acido sulfúrico 1 M
Agua oxigenada 20 volúmenes
Tween 20

Método
Diluir el anti-FVW:Ag humano 1:500 en tampón de carbonato 0,05 M (es decir, 40 µl de antisuero en 20 ml de tampón) y añadir 100 µl a cada pocillo de la placa de microtitulación. Incubar durante 1 h a temperatura ambiente en una cámara de humidificación. Descartar el anticuerpo y lavar 3 veces por inmersión en el seno de solución salina tamponada con fosfato tamponado (PBS) con 0,5 ml/l de Tween durante 2 min, seguido de inversión sobre un papel absorbente.

Preparar diluciones del estándar 100% 1:10, 1:20, 1:40 y 1:60 en PBS con 1 ml/l Tween. Diluir los plasmas del paciente y del control a 1:10, 1:20 y 1:40 de la misma forma y añadir 100 µl de cada dilución por duplicado a los pocillos de la placa de microtitulación. Incubar durante 1 h como antes y repetir el lavado.

Diluir el conjugado de FVW:Ag-peroxidasa 1:500 en 1 ml/l de PBS-Tween (p. ej., 40 µl de anticuerpos en 20 ml de tampón) y añadir 100 µl a cada pocillo. Incubar durante 1 h. Lavar dos veces con 0,5 ml/l PBS-Tween y una vez en tampón citrato fosfato 0,1 M.

Disolver 40 mg de sustrato (OPD) en 15 ml de tampón citrato fosfato. Añadir 10 µl de 20 volúmenes de agua oxigenada a la solución sustrato inmediatamente antes de su uso y, a continuación, añadir 100 µl a cada pocillo.

Cuando el color amarillo ha alcanzado una intensidad a la que un anillo medio amarillento es claramente visible en el fondo de los pocillos, debe detenerse la reacción añadiendo 150 µl de ácido sulfúrico 1 M. Leer la densidad óptica a lo largo de toda la placa a 492 nm utilizando un lector de placa de microtitulación. Representar la curva estándar sobre papel de gráfico logarítmico-lineal. Los niveles de FVW:Ag se obtienen mediante la lectura de la curva de referencia.

Intervalo normal
El intervalo normal se sitúa entre 0,5-2,0 UI/ml.

Interpretación
Los resultados deben interpretarse junto con los resultados del ensayo de factor VIII:C y el ensayo del cofactor de ristocetina (v. tabla 16.7). El FVW:Ag puede también medirse mediante un ensayo inmunoelectroforético. El método del cohete de Laurell para esta determinación se describe en la séptima edición de este libro.

Ensayo inmunoturbidométrico del antígeno del factor Von Willebrand
Las micropartículas de látex, recubiertas con anticuerpos específicos contra el FVW, se incuban con plasma; tiene lugar una reacción antígeno-anticuerpo que conduce a la aglutinación de las micropartículas. La aglutinación de las micropartículas conduce a un incremento en la turbidez y, por lo tanto, en la absorbancia, que se mide fotométricamente. Utilizando una curva estándar puede calcularse la concentración de FVW (Instrumentation Laboratories and Stago).

Ensayo del cofactor de ristocetina[55]
Principio
Las plaquetas lavadas no se aglutinan en presencia de ristocetina a menos que se añada plasma normal como fuente de FVW. La «aglutinación» sigue una curva dosis-respuesta que depende de la cantidad de plasma/FVW añadida. En el ensayo pueden utilizarse plaquetas lavadas en fresco o plaquetas fijadas en formalina. Se tarda más en preparar las plaquetas fijadas, pero éstas no son susceptibles de agregarse con ristocetina (distinguiendo este proceso de la «aglutinación»), y pueden almacenarse de forma que estén disponibles para su uso de emergencia. Las plaquetas lavadas en fresco son más rápidas de preparar y retienen una membrana plaquetaria funcional, pero no pueden conservarse para su uso posterior.

Se encuentran disponibles preparaciones plaquetarias lavadas, fijadas y liofilizadas. Una vez reconstituidas estas preparaciones, son estables durante varias semanas y deben posibilitar la estandarización del ensayo.

Ensayos en que se utilizan plaquetas frescas

Reactivos
K_2EDTA. 0,134 mol/l.

Citrato-solución salina
Un volumen de 31,1 g/l de citrato trisódico + 9 volúmenes de NaCl de 9 g/l.

EDTA-citrato-solución salina
Un volumen de 0,134 mol/l de K_2EDTA + 9 volúmenes de citrato-solución salina.

Método
1. Recoger 40-60 ml de sangre normal en un volumen de un décimo de EDTA-solución salina en contenedores universales de plástico de fondo plano. No utilizar contenedores de fondo cónico. Centrifugar a 150-200 g a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) durante 15 min.

2. Pipetear, utilizando una pipeta de plástico, el plasma rico en plaquetas (PRP) en un contenedor de plástico. Marcar el nivel del plasma en el tubo. Centrifugar a 1.500-2.000 g para obtener un botón plaquetario.
3. Descartar el PPP. Resuspender el botón plaquetario en un volumen de 2 ml de EDTA-citrato-solución salina mezclandólo mediante una pipeta Pasteur hasta que se forme una suspensión homogénea. Añadir EDTA-citrato-solución salina hasta la marca de 20 ml.
4. Centrifugar a 1.500-2.000 g durante 15 min. Descartar el sobrenadante. Resuspender en EDTA-citrato-solución salina y dejar a temperatura ambiente durante 20 min para eluir el cofactor de ristocetina de las plaquetas.
5. Centrifugar de nuevo, descartar el sobrenadante y resuspender en EDTA-citrato-solución salina dos veces más hasta realizar un total de cuatro lavados.
6. Centrifugar a 1.500-2.000 g durante 15 min. Descartar el sobrenadante y resuspender en citrato-solución salina utilizando un volumen ligeramente por debajo del volumen plasmático original (marcado en el contenedor). Centrifugar a 800 g durante 5 min para eliminar agregados de plaquetas, leucocitos y hematíes aglutinados.
7. Eliminar el sobrenadante rico en plaquetas con cuidado. Realizar un recuento plaquetario y diluir la suspensión rica en plaquetas con citrato-solución salina hasta que el recuento plaquetario sea aproximadamente 200 × 10^9/l.
8. Dejar las plaquetas a temperatura ambiente durante 30-45 min para permitir que las plaquetas se recuperen de la agresión del lavado y de la centrifugación.

Reactivos para el ensayo

Citrato-solución salina
Ristocetina
100 mg/ml. Almacenado congelado en volúmenes de 1 ml.

Plasma estándar
PPP
Del o de los paciente(s).

Método
Confirmar que las plaquetas lavadas no «aglutinan» con ristocetina en ausencia de plasma añadido. Repartir 0,5 ml de citrato-solución salina en una cubeta de agregómetro y 0,4 ml de la suspensión de plaquetas + 0,1 ml de citrato-solución salina en otra cubeta. Colocar en la placa de calentamiento y dejar allí durante 3 min para que la temperatura se equilibre. Añadir 5 µl de ristocetina y registrar a 1 cm/min durante 2 min. La absorbancia que resulta del citrato-solución salina por sí solo se toma como el 100% de la aglutinación, y la resultante de las plaquetas solas representa el cero (%) de aglutinación (control).

La absorbancia resultante de la suspensión de plaquetas no debe exceder las 5 divisiones del papel gráfico. Si es mayor, las plaquetas deben lavarse de nuevo y el procedimiento se debe repetir. La lectura de este blanco debe repetirse cada hora. Todas las muestras de plasma y ristocetina deben mantenerse en un baño helado.

Curva estándar
Una curva estándar se obtiene haciendo diluciones dobles, desde 1/2 a 1/32, en citrato-solución salina, del plasma estándar (conjunto de donantes, plasma de referencia comercial u otros materiales de referencia). Se considera que la absorbancia resultante de una mezcla de 0,4 ml de citrato-solución salina y 0,1 ml de dilución de plasma representa el 100% de la aglutinación, y que la resultante de la mezcla de 0,4 ml de suspensión de plaquetas y 0,1 ml de dilución de plasma representa la aglutinación cero (0%).

Añadir 5 µl de ristocetina a la cubeta que contiene la mezcla de aglutinación cero y registrar la aglutinación durante 2 min. Evaluar cada dilución del plasma estándar de la misma forma.

El plasma del paciente es evaluado en dos diluciones, dependiendo de la concentración esperada de FVW en el plasma. Ambas diluciones deben dar aglutinaciones dentro del intervalo propio de la curva estándar.

Restablecer la agregación 100% y cero para cada paciente.

Una lectura del control plaquetario debe ser repetida a intervalos de una hora. Si la lectura difiere del original, la diferencia debe sustraerse de los resultados de las pruebas subsiguientes.

Resultados
Medir la «aglutinación» a 1 o 2 min en función de la intensidad de la «aglutinación». Todas las respuestas pueden ser comparadas en la misma escala temporal y no deben leerse a partir de la «aglutinación» máxima.

Representar la curva estándar sobre papel semilogarítmico recogiendo la «aglutinación» en la escala lineal y la concentración de FVW en U/dl en la escala logarítmica (fig. 16.10). Para cuantificar el ensayo, asignar a la dilución 1/2 de plasma estándar un valor de 0,50 UI/ml. (Cada tanda de estándares es precalibrada como se describió en la pág. 354 y puede no ser necesariamente 1,0 UI/ml.)

Léase la concentración del FVW del paciente directamente a partir de la curva estándar, corregir por el factor de dilución y realizar el promedio de los dos resultados de diluciones diferentes.

Intervalo normal
El intervalo normal es de 0,5-2,0 UI/ml.

Interpretación
La concentración de FVW medida mediante el ensayo de cofactor ristocetina puede sólo interpretarse en conjunto con otros ensayos de factor VIII:C y FVW:Ag, como se muestra en la tabla 16.7.

Ensayo en que se utilizan plaquetas fijadas en formalina

Reactivos

Solución de citrato sódico
32 g/l de citrato de sodio trisódico ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$).

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

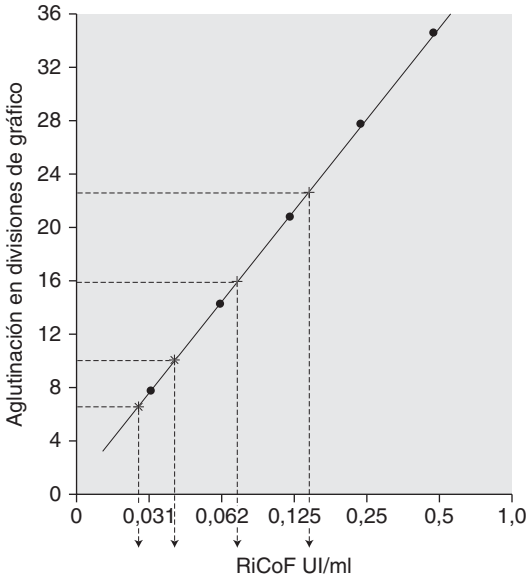


Figura 16.10. Ensayo del cofactor de ristocetina. La curva estándar se representa sobre papel semilogarítmico. Cada plasma problema se ensaya en dos diluciones. El plasma 1 (+) produjo las siguientes lecturas: dilución 1 en 4, 16 divisiones del papel de gráfico = 7 UI (cuatro veces [factor de dilución] = 28 UI/dl); dilución 1 en 2, 22 divisiones = (13 UI/dl [factor de dilución doble] = 26 UI/dl). La media de las dos lecturas es 27 UI/dl. El plasma 2 (*) produjo los siguientes resultados: dilución 1 en 2, 7 divisiones = (2,5 UI [factor de dilución doble] = 5 UI/dl). Diluciones 1 en 4, 5 divisiones (no se muestran). Este resultado fue similar al control y el plasma se evaluó a continuación sin diluir, dando una lectura de 10 divisiones = 4 UI. La media es 4,5 UI/dl (muy baja).

K_2EDTA
0,134 mol/l.

Formalina al 2% (formaldehído al 40%)
En 9 g/l de NaCl.

Azida sódica al 0,05%
En 9 g/l de NaCl.

Método
Se pueden obtener preparaciones adecuadas de sangre en citrato de una bolsa de donación de sangre, de un individuo normal, o a partir de una venoclisis llevada a cabo en un paciente con un recuento plaquetario normal. La solución ácido-citrato-dextrosa o citrato-fosfato-dextrosa de la bolsa de donante es eliminada a través de la aguja de toma y reemplazada por un volumen equivalente de citrato sódico. Recoger unos 500 ml de sangre.

Centrifugar la sangre a 300 g durante 15 min a temperatura ambiente. Separar el PRP y añadir 9 volúmenes de PRP a 1 volumen de solución EDTA. Incubar durante 1 h a 37 °C para revertir el efecto del ADP liberado durante la preparación. Añadir un volumen equivalente de formalina al 2% y dejar a 4 °C durante 1 h. Centrifugar a 200 g durante 10 min a 4 °C. Decantar el sobrenadante y volver a centrifugarlo a 250 g durante 20 min a 4 °C. Descartar el sobrenadante y volver a suspender el sedimento plaquetario en 9 g/l de NaCl frío (4 °C). Lavar las plaquetas dos veces más. Después del lavado final, resuspender las plaquetas en la solución de azida sódica. Ajustar el recuento plaquetario a 300-500 × 10^9/l. La suspensión es estable durante 1 mes a 4 °C.

También se dispone de plaquetas fijadas comerciales.

Reactivos para el ensayo

Tampón para las diluciones del plasma
Tampón de barbital, pH 7,4, que contenga 40 mg/ml de albúmina sérica bovina (v. pág. 590).

Ristocetina, estándar plasmático y PPP del paciente
Como se describió en el ensayo previo.

Método
Seguir el método descrito para el lavado de plaquetas frescas. Preparar todas las diluciones de plasma en el tampón que contiene albúmina.

Los resultados, la interpretación y el intervalo normal son los descritos para el ensayo con plaquetas lavadas.

Ensayo de unión de colágeno (ELISA)

El ensayo de unión de colágeno a FVW basado en ELISA (FVW:CB) se desarrolló como una alternativa al FVW:RCo como una medida de actividad funcional del FVW. Tiene la ventaja sobre el FVW: RCo de utilizar un sistema basado en ELISA, con menor CV y mayor precisión. Lógicamente, debido a que mide la propiedad de unión de un ligando diferente a ristocetina, debe ser visto como complementario en vez de como un ensayo alternativo de la función del FVW. De hecho, algunos casos de EVW tienen FVW:RCo reducidos pero FVW:CB normales. Las condiciones del ensayo han sido ajustadas para que el resultado sea sensible a la presencia de multímeros de FVW de alto peso molecular y, por tanto, a su actividad funcional *in vivo*[56].

El método ELISA de ensayo de unión de colágeno se basa en la capacidad del FVW de unirse al colágeno. La fuente de colágeno es una variable importante, y las tiras de los pocillos de la prueba de ELISA están recubiertos con colágeno humano tipo III[57]. Después de la incubación con el plasma problema, la cantidad de FVW unido se detecta utilizando un anticuerpo anti-FVW-peroxidasa conjugado. La unión anticuerpo-peroxidasa se cuantifica de la forma habitual, y la intensidad del color generado es directamente proporcional a la concentración de FVW:CB. Utilizando una curva de referencia, se cuantifica FVW:CB.

Los equipos de ensayo de unión a colágeno pueden obtenerse de compañías como Technoclone y Gradipore. Los detalles del ensayo se encuentran en las instrucciones del fabricante. Pueden variar entre fabricantes e incluso de lote a lote con el mismo equipo. Debe prestarse especial atención a la fecha de caducidad de los equipos. Cada laboratorio debe establecer su propio intervalo de normalidad.

Análisis de multímeros del antígeno de factor Von Willebrand en muestras de plasma[58]

Método de análisis de multímeros no radioactivo

Los análisis de los multímeros del antígeno de factor Von Willebrand son importantes en el diagnóstico y tratamiento de la EVW. El patrón oro es el método autorradiográfico descrito por Enayat y Hill[58]. Este método utiliza iodo radioactivo (I^{125}) y sólo se lleva a cabo en unos pocos centros especializados.

El método no radioactivo descrito aquí utiliza anticuerpos contra el FVW:Ag conjugado con peroxidasa para poder sustituir el anticuerpo radioactivo descrito en ediciones previas.

Las muestras plasmáticas se diluyen en un tampón que contiene urea 8 M y dodecil sodio sulfato (SDS) y se calientan para asegurar que la movilidad de la proteína se relaciona con el tamaño y no con la carga molecular. Las muestras son sometidas a electroforesis a través de un gel de gradiente discontinuo de agarosa a pH 6,8 y posteriormente a través de un gel separador de mayor concentración de agarosa a pH 8,8. Después de migrar durante la noche sobre una placa de enfriamiento, la proteína es fijada en el gel, lavada e incubada con un anticuerpo anti-FVW:Ag conjugado a peroxidasa seguido de un extenso lavado. Los multímeros de FVW:Ag son revelados añadiendo un reactivo de sustrato de color y realizando un escaneado del gel. La imagen escaneada se modifica utilizando un programa informático de edición fotográfica (p. ej., Microsoft Picture It o Corel Draw Graphics Suite) para producir una imagen en blanco y negro adecuada para la presentación.

La técnica descrita aquí utiliza un gel de agarosa en un sistema de tampón discontinuo. El método parece ser menos proclive a presentar problemas técnicos que un sistema de acrilamida/agarosa y sin embargo puede distinguir claramente los patrones conocidos de los subtipos de EVW.

Reactivos

Peroxidasa de rábano conjugada con anti-FVW:Ag humano
Laboratorios DAKO.

Agarosa, grado de ADN ultrapuro
Seakem, código n.º LE 49052-5.

SDS
BDH.

Glicina
BDH.

EDTA sódico
BDH.

Ácido clorhídrico
BDH.

Propano-2-ol
BDH.

Ácido acético
BDH.

Tris Base (T1503)
BDH.

Azul de bromofenol
Sigma.

Marvel o Baby Milk
Mothercare.

Agua desionizada

Preparación de soluciones madre

242,2 g Tris 2 M por litro de agua (121,1 g/500 ml de agua desionizada).
26,2 ml HCl 3 M (1 N HCl, SG 1,18)/100 ml de agua desionizada.
3,3624 g/l Na_2 EDTA 0,01 M o 0,336 g/100 ml de agua desionizada.
Estos tres reactivos pueden almacenarse a 4 °C hasta durante 3 meses.

Preparación de tampones

Tampón de gradiente discontinuo
25,0 ml de Tris 2 M.
15,8 ml de HCl 3 M.
Rellenar hasta 100 ml con agua desionizada.
Comprobar que el pH es 6,8.
Puede ser almacenado a 4 °C hasta 2 semanas.

Tampón de migración
75,0 ml de Tris 2 M.
8,9 ml de HCl 3 M.
Rellenar hasta 100 ml con agua desionizada.
Comprobar que el pH es 8,8.
Puede ser almacenado a 4 °C durante hasta 2 semanas.

Tampón muestra
500 µl de Tris, 2 M.
10 ml de EDTA depósito.
Rellenar hasta 100 ml con agua desionizada.
Puede ser almacenada 4 °C hasta durante 4 semanas.

Para utilizar
9,61 g urea.
0,4 g SDS.
Disolver en tampón muestra y rellenar hasta 20 ml.
Puede ser necesario templar para disolver.
Ajustar cuidadosamente el pH a 8,0 con HCl 1 M.
Utilizar dentro del mismo día de su preparación.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

10% SDS
1 g de SDS disuelto en agua desionizada a un volumen final de 10,0 ml. Almacenar a 4 °C para prevenir el crecimiento bacteriano; dejar calentar a temperatura ambiente antes de utilizar. Desecharlo después de 4 semanas de su almacenamiento.

Tampón de electroforesis
57,6 g de glicina.
12,0 g de base Tris.
2,0 g de SDS.
Disolver y rellenar hasta 2 l con agua desionizada. Prepararla el mismo día de uso. Enfriar a 4 °C previamente a la electroforesis.

Fijador ácido/alcohol
100 ml de propano-2-ol.
40 ml de ácido acético.
Rellenar hasta 400 ml con agua desionizada.
Soluciones de lavado (0,5 ml/l Tween 20 PBS).

Solución salina fosfato tamponada 0,01 M, pH 7,2
0,39 g de $NaH_2PO_4.2H_2O$.
2,68 g de $Na_2HPO_4.12H_2O$.
8,474 g de NaCl.
Rellenar hasta 1 l con agua desionizada.
La solución de lavado se prepara añadiendo 0,5 ml/l de Tween 20.

Tampón de coloración (tampón de citrato fosfato 0,1 M, pH 5,0)
8,8 g de ácido cítrico.
24,0 g de $Na_2HPO_4.12H_2O$.
Rellenar hasta 1 l con agua desionizada.

Reactivo colorante
60 mg de ortofenilenediamina (OPD).
120 ml de tampón citrato fosfato 0,1 M.
40 µl de agua oxigenada (20 volúmenes). Añadir justo antes de su utilización.

Preparación de geles

Gel de migración (agarosa al 1,6%, SDS 0,1%)
1,6 g de agarosa.
25,0 ml de tampón de migración.
74,0 ml de agua desionizada.
1,0 ml de SDS al 10% (añadir al final para evitar que se forme espuma).

Disolver la agarosa mediante calentamiento en un matraz cónico utilizando un horno microondas. Colocar una tapa de cristal sobre la parte superior del matraz cónico para minimizar la pérdida de agua, manteniendo así la correcta concentración de agarosa. Asegurar que la agarosa se ha disuelto completamente. Añadir el SDS a la solución de agarosa en último término para evitar la producción excesiva de espuma. Mantener a 60 °C en un baño de agua.

Pegar la cara hidrofílica del adhesivo del gel estándar (Pharmacia LKB) a una placa de cristal limpia (10 × 205 mm) utilizando unas cuantas gotas de agua. Montar el gel entre la cara hidrofóbica y una placa de cristal limpia separados por un espaciador de 1 mm, utilizando pinzas Bulldog para mantener el molde unido. Calentar el molde previamente a la adición de la agarosa fundida manteniéndola a 37 °C en un horno. Dejar el gel resultante (183 × 100 mm) reposar a 4 °C en un frigorífico.

Gel de gradiente discontinuo (agarosa al 0,8%, SDS al 0,1%)
0,32 g de agarosa.
10,0 ml de tampón de *gradiente discontinuo* cuatro veces.
29,6 ml de agua desionizada.
0,4 ml de SDS al 10%.
Disolver calentando como se explicó previamente.

Adición del gel de gradiente al gel de migración
Desmontar cuidadosamente el molde de gel de migración y eliminar 1,5 cm de la parte superior del gel utilizando la hoja de bisturí limpia. Después de su reensamblaje, verter el gel de *gradiente discontinuo* para llenar el molde. Dejar reposar el gel a 4 °C en un frigorífico durante varias horas.

Preparación de muestras
Diluir las muestras de plasmas en tampón de muestra como sigue:
250 µl de muestra.
700 µl de tampón de muestra.
15 µl de azul de bromofenol al 1%.
Colocar las muestras diluidas a 60 °C para exactamente 30 min; después mantenerlas a 4 °C por no más de 30 min previamente a la electroforesis.

Electroforesis (tarde del día 1)
Poner el sistema de enfriamiento a 8 °C para alcanzar una temperatura del gel de 13 °C. Preparar mechas a partir de papeles de filtro de 24 cm tipo «J-cloths» (Johnson and Johnson) y Whatman n.º 1. Doblar un papel de filtro por la mitad y marcar los bordes doblados a 27 mm de sus respectivos extremos. A partir de estas marcas dibujar líneas en ángulos rectos y unir los puntos donde cortan el arco. Cortar el rectángulo dibujado de esta forma, que actuará como parte de una mecha. Cortar también dos rectángulos de «J-cloth» de doble grosor de 183 × 120 mm. Colocar 500 ml de tampón de electroforesis frío en cada reservorio del tanque de electroforesis.

Nuevamente, desmontar el molde con cuidado; eliminar el adhesivo del gel, dejando el gel sobre la placa de cristal. Utilizando una plantilla, cortar 10 pocillos de 10 × 2 mm en el gel de *gradiente discontinuo* a 8 mm de la interfase de los geles de corrido y de *gradiente discontinuo*. Colocar el gel en la platina de enfriado. Humedecer dos mechas de papel de filtro en el tampón de electroforesis y colocar sobre el gel a unos 5 mm de cada extremo. Humedecer dos mechas de J-cloth en tampón de electroforesis, colocando una completamente sobre la mecha de papel en el extremo

final del gel de migración y la otra sobre la mecha de papel en el extremo final del gel de *gradiente discontinuo*, dejando una pequeña porción de la mecha de papel visible.

Pipetear 35-40 µl de muestra diluida en cada pocillo, con cuidado de no tocar la mecha. Realizar la electroforesis del gel a una corriente constante de 5 mA por gel (aproximadamente 65 V). Parar la electroforesis cuando el tinte azul haya migrado 1 cm a partir de cada pocillo. Eliminar con cuidado el líquido residual de cada pocillo, y rellenar cada uno de ellos con gel de *gradiente discontinuo* fundido. Empezar la electroforesis con la misma corriente. Después de un total de 18-20 h, el tinte se habrá escapado del gel hacia la mecha y la electroforesis se habrá completado.

Fijación del gel (mañana del día 2)

Separar cuidadosamente el gel de la placa de cristal y fijarlo durante 1 h utilizando la solución fijadora ácida/alcohol en un contenedor adecuado.

Lavado del gel (día 2)

Una vez fijado, lavar el gel en 3 cambios de agua destilada durante un total de 3 h. Transferir el gel a una bandeja de plástico pequeña y lavarlo con leche en polvo al 1% durante 20 min y posteriormente con leche en polvo al 10% durante 20 min. Lavar el gel profusamente con Tween 20 STF 0,5 ml/l durante el resto del día.

Adición del FVW:Ag antihumano de conejo conjugado con peroxidasa (tarde del día 2)

Diluir 400 µl del FVW:Ag antihumano de conejo conjugado con peroxidasa en 400 µl de 0,5 ml/l Tween 20 STF. Añadirlo después al gel en la bandeja y mezclarlo suavemente durante toda la noche. Colocar una lámina plástica sobre la bandeja para evitar la evaporación.

Lavado intensivo (dos días y noches)

Eliminar la mezcla del anti-FVW:Ag humano de conejo conjugado con peroxidasa. Retirar el gel de la bandeja de plástico y colocar en otra bandeja de fondo plano. A continuación, lavar profusamente el gel con frecuentes cambios de 0,5 ml/l Tween 20 STF durante los dos días y noches siguientes.

Adición del sustrato de color (día 5)

Preparar el reactivo colorante añadiendo 6 × 10 mg de pastillas de OPD a 120 ml de tampón de citrato fosfato 0,1 M. Añadir 40 µl de agua oxigenada justo antes de utilizar. Colocar el gel en una bandeja de plástico, verter el reactivo colorante sobre el gel, y mezclar con cuidado. Asegurarse de que el reactivo colorante alcanza el gel también por debajo. Cuando el color empieza a aparecer, eliminar el gel de la bandeja de plástico y colocar entre dos láminas de adhesivo de gel, eliminando cualquier exceso de reactivo sustrato.

Escaneado del gel en desarrollo

Cuando los patrones multiméricos se hacen visibles, el gel está listo para ser escaneado. El gel continuará desarrollando color durante varios minutos y finalmente el gel de fondo se hará demasiado oscuro para ver los patrones multiméricos con claridad. Escanear el gel varias veces conforme se desarrolla el color para conseguir la mejor imagen de los patrones multiméricos.

El gel escaneado presentará el aspecto que se muestra en la figura 16.11A. La sección superior es el gel de *gradiente discontinuo,* donde las muestras se añadieron previamente a la electroforesis; el cuerpo principal del gel es el gel de migración, que muestra los patrones multiméricos. La imagen escaneada se manipula utilizando programas de edición fotográfica como Microsoft Picture It o Corel Draw Graphics Suite. Las manipulaciones se muestran en la figura 16.11A-E: se corrige la tinción de la imagen, se convierte a una imagen monocrómica y se realizan ajustes en brillo y contraste.

Interpretación[51]

Véase la figura 16.12.

Investigación de la sospecha de un trastorno de la función plaquetaria, heredado o adquirido

(Para los ensayos de investigación de la EVW, v. pág. 359; para el diagnóstico de trombocitopenia, v. págs. 19 y 580.)

Las alteraciones de la función plaquetaria conducen a la aparición de signos y síntomas característicos de defectos en la hemostasia primaria: sangrado en membranas mucosas, epistaxis, menorragias y pequeñas equimosis cutáneas. El paciente puede también sufrir un sangrado intraoperatorio o postoperatorio y sangrado continuo a través de pequeños cortes o heridas.

Estudios de laboratorio de las plaquetas y de la función plaquetaria[59]

El recuento plaquetario en sangre periférica y el tiempo de sangría cutáneo o el PFA-100 son las pruebas de primera línea para evaluar la función plaquetaria. Sin embargo, algunos trastornos de la función plaquetaria no se detectan con estas pruebas[49]. Puede obtenerse información adicional inspeccionando una muestra de sangre en fresco, que puede mostrar alteraciones en el tamaño o la morfología de las plaquetas con potencial importancia diagnóstica.

Si los procedimientos de detección o la historia clínica sugieren un trastorno de la hemostasia primaria y la función del FVW es normal, debe organizarse la realización de pruebas más complejas. Los fármacos y ciertos alimentos (tabla 16.8) pueden afectar a las pruebas de función plaquetaria, y se debe pedir al paciente que deje de tomar tales sustancias durante al menos 7 días antes de la prueba.

La secuencia habitual de investigación se muestra en la figura 16.13. Las pruebas de la función plaquetaria pueden dividirse en seis grupos fundamentales (tabla 16.9): pruebas de adhesión, pruebas de agregación, evaluación del contenido granular, evaluación de la reacción de liberación, investigación de las vías de la prostaglandina y pruebas de la actividad coagulante plaquetaria. La expresión de las glucoproteínas plaquetarias puede evaluarse mediante

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

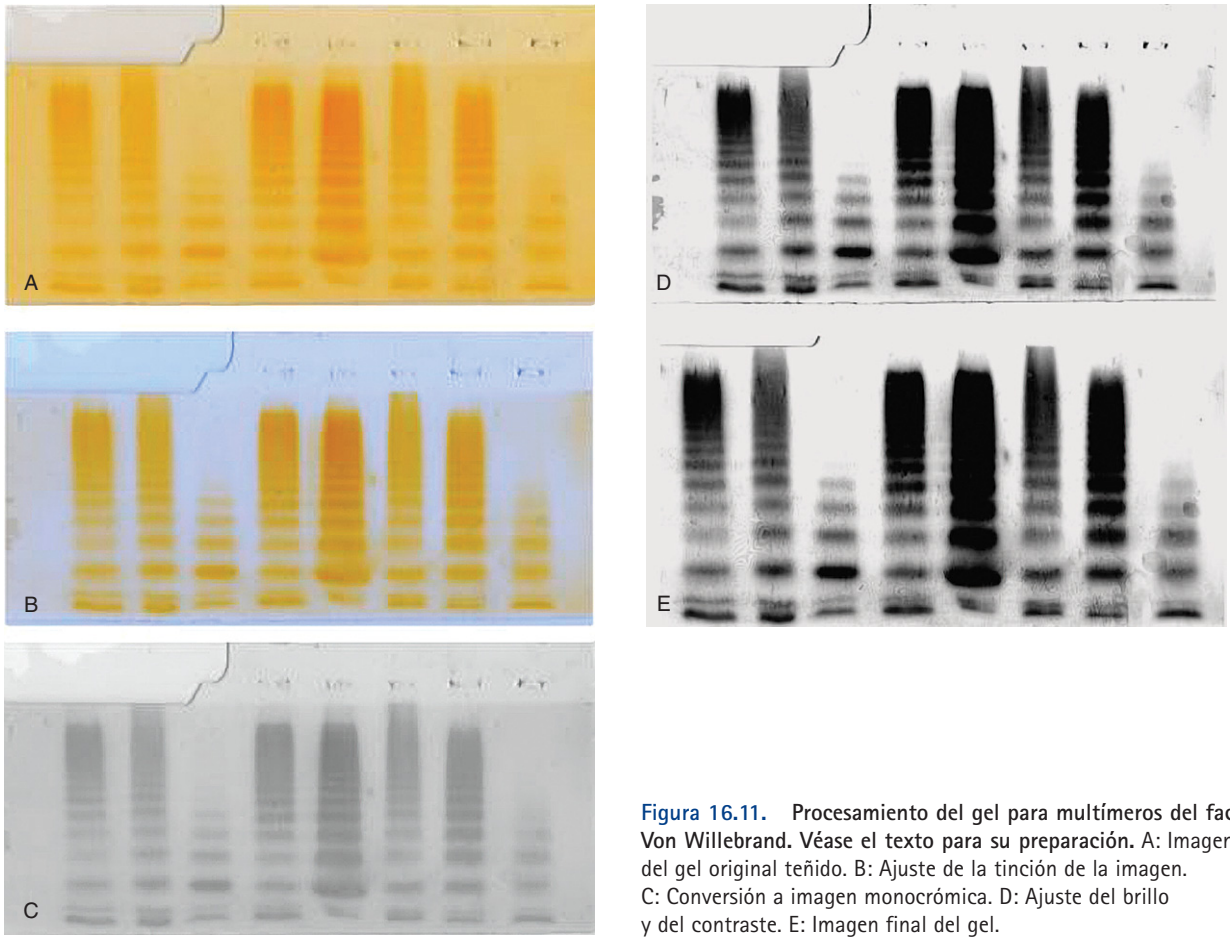


Figura 16.11. Procesamiento del gel para multímeros del factor Von Willebrand. Véase el texto para su preparación. A: Imagen del gel original teñido. B: Ajuste de la tinción de la imagen. C: Conversión a imagen monocrómica. D: Ajuste del brillo y del contraste. E: Imagen final del gel.

citometría de flujo, aunque esto no se correlaciona necesariamente con la actividad funcional.

El contenido *granular* de las plaquetas puede evaluarse mediante microscopia electrónica o midiendo las sustancias liberadas. La liberación de nucleótidos de adenina y serotonina de los gránulos densos se estudia en un laboratorio especializado. La liberación de β-tromboglobulina y de factor plaquetario 4 puede medirse utilizando equipos de radioinmunoensayo comerciales pero hay problemas con la reproducibilidad e interpretación de los resultados. La liberación de gránulos α se estudia principalmente como un marcador de la activación plaquetaria *in vivo* y de la tendencia trombótica. El FVW plaquetario se mide para diagnosticar algunas variantes de EVW.

Si los estudios de agregación iniciales sugieren un defecto en la vía de las prostaglandinas, el TXB_2 puede estimarse cuantitativamente mediante un ensayo radioinmunitario. Se dispone de ensayos altamente específicos de varios pasos del metabolismo del ácido araquidónico, pero éstos están fuera del alcance habitual de un laboratorio clínico.

La actividad coagulante plaquetaria, es decir, la finalización del «vaivén» de la membrana, puede medirse indirectamente utilizando el índice de consumo de protrombina. Esta prueba se lleva a cabo rara vez ahora pero es anormal en el síndrome de Scott; se trata de un trastorno hemorrágico infrecuente, que describimos en la séptima edición de este libro. De forma alternativa, la exposición de la fosfatidil serina puede evaluarse directamente por citometría de flujo (v. más adelante).

Agregación plaquetaria

Principio

La absorbancia de luz del plasma PRP disminuye conforme se agregan las plaquetas. La intensidad y la velocidad de caída dependen de la reactividad plaquetaria al agonista añadido siempre que otras variables, como temperatura, recuento plaquetario y velocidad de mezclado, se controlen. Los cambios en la absorbancia se monitorizan en una hoja de registro.

Reactivos

Plasma rico en plaquetas control y problema

El paciente y el sujeto control no deben estar tomando ningún fármaco, bebida o comida que pueda afectar a la agregación durante al menos los 10 días previos (v. tabla 16.8) y preferiblemente deben haber ayunado desde la noche

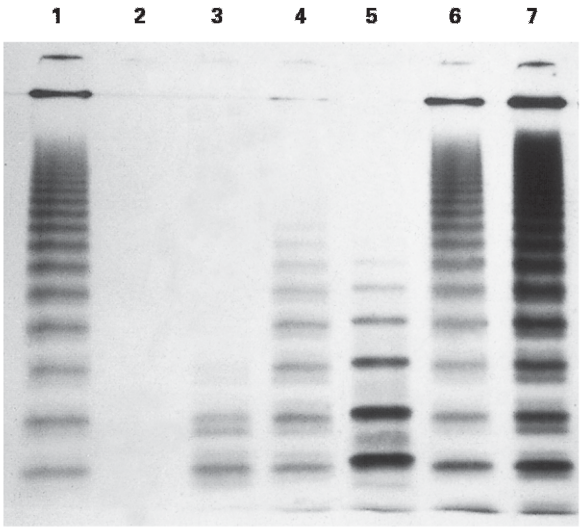


Figura 16.12. Autorradiografía del análisis electroforético de los patrones multiméricos del factor de Von Willebrand (FVW). Los multímeros de peso molecular más elevado aparecen en la parte alta del gel. El patrón normal con numerosos multímeros grandes y un patrón en triplete visible en los multímeros más pequeños se muestra en el carril 7. Los carriles 1 y 6 son más compatibles con la EVW tipo 1 en la que existe una disminución generalizada en el número de multímeros pero el patrón de tripletes normal se mantiene. En el carril 2 no se detecta FVW, lo que indica una EVW tipo 3. Los carriles 3 y 5 muestran tanto anormalidades de la cantidad de FVW como en el patrón de multímeros, lo cual es indicativo de un tipo 2 A. En el carril 4 hay una pérdida selectiva de los multímeros grandes típica de la EVW tipo 2B.

Tabla 16.8. Sustancias que afectan con frecuencia a la función plaquetaria

Agentes que afectan la síntesis de prostanoides
Aspirina
Fármacos antiinflamatorios no esteroideos
Corticosteroides
Agentes que se unen a receptores y membranas plaquetarias
α-antagonistas
Bloqueadores β
Antihistamínicos
Antidepresivos tricíclicos
Anestésicos locales
Ticlopidina
Clopidogrel
Agentes bloqueantes IIb, IIIa
Antibióticos
Penicilina
Cefalosporinas
Agentes que incrementan los niveles de adenosina monofosfato cíclico (AMPc)
Dipiridamol
Aminofilina
Prostanoides
Otros
Heparina
Dextrano
Etanol
Clofibrato
Fenotiazinas
Ajo

previa porque la presencia de quilomicrones puede también alterar los patrones de agregación.

Recoger 20 ml de sangre venosa aplicando una mínima oclusión venosa y añadirlos a un volumen de un décimo de citrato trisódico (v. pág. 588) contenido en un tubo de plástico o siliconado. La sangre no debe enfriarse porque el frío activa las plaquetas. El PRP se obtiene centrifugando a temperatura ambiente (unos 20 °C) durante 10-15 min a 150-200 g. Retirar cuidadosamente el PRP evitando la contaminación con los hematíes o la capa leucocitaria, y colocar en un tubo de plástico con tapón. Almacenar a temperatura ambiente hasta el estudio. La mezcla es estable durante aproximadamente 3 h. Es importante evaluar todas las muestras después de un intervalo similar de tiempo (p. ej., 1 h) y almacenarlas a la misma temperatura para minimizar la variación.

Plasma pobre en plaquetas control y problema

Centrifugar la sangre restante a 2.000 g durante 20 min para obtener PPP.

Estandarización de plasma rico en plaquetas

Se lleva a cabo un recuento plaquetario sobre el PRP. El número de plaquetas influirá en la respuesta de agregación si el recuento cae fuera de 200-400 × 10^9/l. Para recuentos de PRP muy altos, debe ajustarse diluyendo el PRP en el PPP del paciente. Los recuentos plaquetarios menores de 200 × 10^9/l darán lugar a respuestas de agregación disminuidas. No se recomienda la ulterior centrifugación del PRP porque induce la activación plaquetaria. El PRP control debe diluirse en el mismo recuento y analizarse para comparar resultados. El PRP debe almacenarse siempre en tubos firmemente tapados que estén llenos hasta el tope para evitar cambios en el pH, que también afectan a la agregación plaquetaria y a las pruebas de liberación de nucleótidos.

Agentes agregantes

Los cinco agentes agregantes enumerados a continuación deben bastar para el diagnóstico de la mayoría de los trastornos funcionales. Para propósitos de investigación y cuando se investigan enfermedades similares poco habituales, pueden también utilizarse otros agonistas enumerados en la tabla 16.9.

Adenosina 5-difosfato

Se utiliza la sal de sodio anhidra de ADP. Preparar una solución de depósito disolviendo 4,93 mg de sal trisódica o 4,71 mg de la sal disódica en 10 ml de NaCl 9 g/l, pH 6,8. Esto da lugar a una solución de 1 mmol/l. Almacenar en volúmenes de 0,5 ml a –40 °C hasta su utilización; conti-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 16.9. Pruebas de la función plaquetaria

Pruebas de adhesividad
Retención en una columna de microesferas de cristal
Técnica de Baumgartner
PFA-100
Pruebas de agregación
Técnicas turbidimétricas utilizando ADP
Colágeno
Ristocetina
Adrenalina
Trombina
Ácido araquidónico
Análogos de endoperóxidos
Ionóforo de calcio
Investigación del contenido granular y liberación
Cuerpos densos
Microscopia electrónica
Contenido de ADP y ATP (bioluminiscencia)
Liberación de serotonina
Gránulos
β-Tromboglobulina
Factor plaquetario- 4
FVW
Fluorescencia por citometría de flujo
Vías de las prostaglandinas
Radioinmunoensayo TXB_2
Actividad coagulante plaquetaria
Índice de consumo de protrombina
Citometría de flujo
Expresión de glucoproteína de superficie
Activación de la expresión de superficie de P-selectina (CD62)
Unión de fibrinógeno
Unión de anexinas (a fosfatidil serina)
Cambios conformacionales en IIbIIIa
Fluorescencia de gránulos plaquetarios

ADP, adenosina 5'-difosfatasa; ATP, adenosina 5'-trifosfatasa; FVW, factor de Von Willebrand.

núan estables hasta durante 3 meses a esta temperatura. Una vez descongelada, la solución debe usarse en las 3 h siguientes y después desecharse. Para las pruebas de agregación, preparar soluciones de 100, 50, 25, 10 y 5 μmol/l.

Colágeno 1 mg/ml (Mascia Brunelli, Sigma, Helena)

Este colágeno es una solución madre de 1 mg/ml. Para su uso, diluir en el tampón suministrado con el colágeno o en dextrosa al 5% para obtener concentraciones de 10 y 40 μg/l. Cuando se diluye 1:10 en PRP (v. más adelante), las concentraciones finales serán 1 y 4 μg/ml.

Sulfato de ristocetina (American Biochemical & Pharmaceutical Corporation)

Cada vial de sulfato de ristocetina contiene 100 mg de ristocetina y debe almacenarse a 4 °C hasta que se disuelve; a cada vial se añaden 8 ml de NaCl 9 g/l para así obtener una solución de 12,5 mg/ml. Almacenar a –40 °C en volúmenes de 0,5 ml hasta que se usen. La ristocetina puede ser recongelada después de su utilización. No debe utilizarse a concentraciones superiores a 1,4 mg/ml debido a que puede precipitar las proteínas del plasma y dar lugar a falsos resultados.

Ácido araquidónico

El ácido araquidónico es una sal de Na, de una pureza del 99%. Disolver el contenido de un vial de 10 mg en 1,5 ml de agua estéril mezclando suavemente para generar una solución madre con una concentración de 20 mmol/l. Ésta puede congelarse en volúmenes de 0,5 ml a –20 °C para su uso posterior. Preparar una solución operativa realizando diluciones dobles del depósito en solución salina para dar soluciones de 5 y 10 mmol/l.

Adrenalina (epinefrina)

Disolver 3,33 mg de bitartrato de 1-adrenalina en 10 ml de agua para preparar una solución madre de 1 mmol/l. Almacenar en volúmenes de 0,5 ml a –40 °C. Las soluciones de 20 y 200 μmol/l se preparan para ser utilizadas en solución salina tamponada con barbital, pH 7,4.

Nota

Todos los reactivos para la agregación deben mantenerse en hielo hasta ser usados.

Método

La centrifugación puede causar liberación celular de ADP y refractariedad plaquetaria a la agregación, y la prueba de agregación real no debe empezarse en los 30 min siguientes a la preparación del PRP. Sin embargo, las pruebas deben completarse en las 3 h siguientes y siempre que se pueda en las 2 h posteriores a la preparación del PRP. Las plaquetas que se dejan reposar a temperatura ambiente (unos 20 °C) se hacen crecientemente reactivas a la adrenalina y en algunos casos al colágeno; la tasa de cambio se incrementa pasadas las 3 h.

Encender el agregómetro aproximadamente 30 min antes de que se lleven a cabo las pruebas para permitir que la plancha de calor se caliente hasta 37 °C. Colocar la velocidad de giro a 900 rpm. Pipetear el volumen adecuado de PRP (esto varía dependiendo de la marca) en un tubo de plástico o cubeta. Colocar el tubo en la plancha de calentado. Después de 1 min insertar el agitador dentro del plasma. Programar la transmisión a 0 en el registro de gráficos. Sustituir con una cubeta que contenga PPP y programar la transmisión al 100%. Repetir este procedimiento hasta que no sea necesario hacer más ajustes y la pluma atraviese la mayor parte de la anchura del papel de gráfico en respuesta a la diferencia de absorbancia entre el PRP y el PPP.

Dejar que el PRP se caliente hasta 37 °C durante 2 min y a continuación añadir 1:10 volúmenes del agonista. Registrar el cambio de absorbancia hasta que la respuesta alcance una meseta o durante 3 min (lo que ocurra antes). Repetir este procedimiento para cada agonista. La cantidad

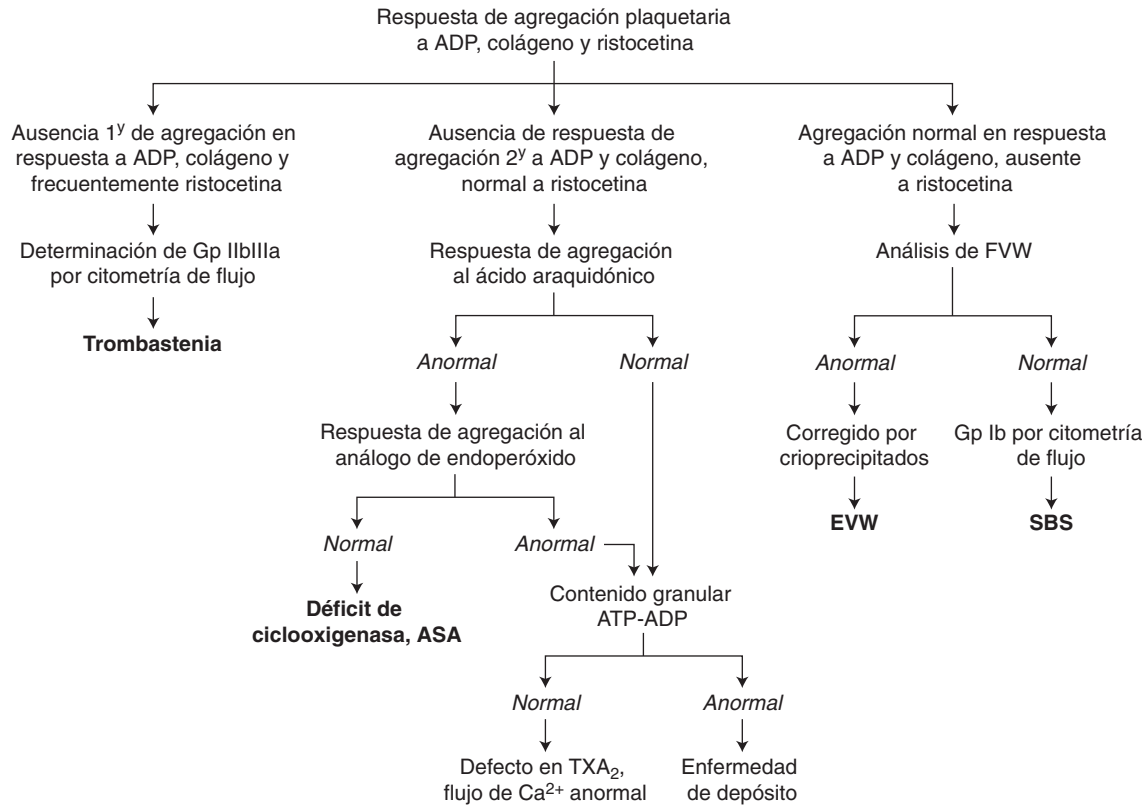


Figura 16.13. Diagrama de flujo para la investigación de la sospecha de disfunción plaquetaria. ASA, efecto de la ingesta de aspirina; DA, defecto de almacenamiento; EVW, enfermedad de Von Willebrand; ITP, recubrimiento de plaquetas por autoanticuerpos en la púrpura trombocitopénica idiopática; SBS, síndrome de Bernard-Soulier.

inicial para cada agonista es la menor concentración preparada como se describió antes. Si no se obtiene liberación, incrementar la concentración hasta que se obtenga una respuesta satisfactoria.

Interpretación

Las curvas de agregación plaquetaria normal y anormal se muestran en las figuras 16.14 y 16.15.

Adenosina 5-difosfato

Las bajas concentraciones de ADP (<0,5 a 2,5 μmol/l) causan una agregación primaria o reversible. Primero, el ADP se une al receptor de membrana y libera iones Ca^{2+}. Se forma un complejo reversible con fibrinógeno extracelular, y las plaquetas experimentan un cambio de forma que se refleja en un ligero incremento de la absorbancia. Después de esto, el fibrinógeno unido se suma al contacto entre célula y célula y tiene lugar la agregación reversible. A muy bajas concentraciones de ADP, las plaquetas pueden desagregarse después de la primera fase. En presencia de concentraciones superiores de ADP una onda secundaria de agregación irreversible se asocia con la liberación de gránulos densos y α como resultado de la activación de la vía del ácido araquidónico. Si sólo se utilizan dosis altas de ADP, los defectos en la primera onda (midiendo la segunda vía como se describe en la pág. 328) no se detectarán.

Colágeno

La respuesta de agregación al colágeno está precedida por una fase de latencia corta entre los 10 y los 60 s. La duración de la fase de latencia es inversamente proporcional a la concentración de colágeno utilizada y a la respuesta de las plaquetas evaluadas. Esta fase se sigue de una onda única de agregación que es resultado de la activación de la vía del ácido araquidónico y la liberación de los gránulos. Dosis más altas de colágeno (>2 μg/ml) causan un súbito incremento de concentración de calcio intraplaquetario, y esto puede suscitar la reacción de liberación sin activar la vía de las prostaglandinas. Las respuestas de colágeno deben por tanto medirse siempre utilizando concentraciones de 1 y 4 μg/ml.

Ristocetina

La ristocetina reacciona con el FVW y el receptor de membrana para inducir que las plaquetas se amontonen juntas («aglutinación»). No activa ninguna de las tres vías de agregación y no causa inicialmente la liberación de gránulos. La respuesta se evalúa en virtud del ángulo de la pendiente inicial. Se estudia inicialmente la respuesta plaquetaria a 1,2 mg/ml. Las concentraciones por encima de 1,4 mg/ml pueden causar una «aglutinación» plaquetaria inespecífica como resultado de la interacción entre la ristocetina y el fibrinógeno y la precipitación de proteínas.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

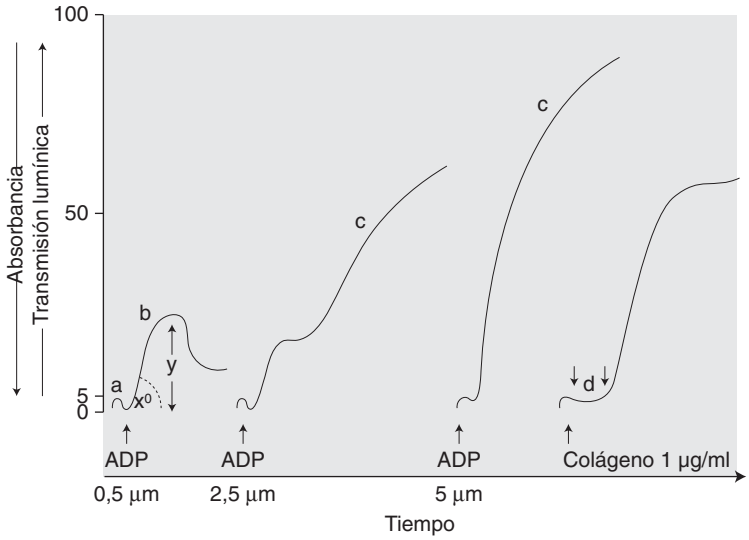


Figura 16.14. Trazados obtenidos durante la agregación de plasma rico en plaquetas. A: Cambio de forma. B: Onda de agregación primaria. C: Onda de agregación secundaria. d, fase de latencia; x^0, ángulo de la pendiente inicial de agregación; y, altura de la marca de agregación; µm = µmol/l. (Reproducido con el permiso de los autores y el editor de Yardumian y cols.[60])

Ácido araquidónico

El ácido araquidónico induce la generación de TXA_2 y la liberación de gránulos incluso cuando hay un defecto en la unión del agonista a la membrana de la superficie o de la liberación de araquidonato endógeno inducida por fosfolipasa. Si los ulteriores pasos a lo largo de la vía están alterados, como en caso de falta o inhibición de la ciclooxigenasa (p. ej., efecto de la aspirina), el ácido araquidónico no producirá una agregación normal.

Adrenalina (epinefrina)

La agregación no viene precedida por un cambio de forma, pero la respuesta subsiguiente imita la respuesta al ADP. Con las concentraciones de 2-10 µmol/ml se suele obtener una respuesta similar. Algunas personas clínicamente normales tienen respuestas muy reducidas a la adrenalina.

Cálculo de los resultados[59,60]

Los resultados pueden expresarse de una de las tres siguientes formas:

1. Como una disminución en el porcentaje de absorbancia medida a los 3 min después de la adición de un agonista (v. fig. 16.14; y). Esto no proporciona información alguna sobre la forma de la curva.
2. Por la pendiente inicial del trazado de la agregación (v. fig. 16.14; x^0). Esto indica la tasa de agregación pero no muestra si ha tenido lugar una agregación secundaria.
3. Por la cantidad mínima de agonista requerida para inducir una respuesta secundaria.

Intervalo normal

Las plaquetas de los sujetos normales habitualmente producen una única onda primaria reversible con 1 µmol/l de ADP o menos, agregación bifásica con ADP a 2,5 µmol/l, y una onda simple irreversible a 5 o 10 µmol/l. Con 1 y 4 µg/ml de colágeno se observa una respuesta monofásica después de una fase de latencia que no dura más de 1 min. Con 1,2 mg/ml de ristocetina y después de 50 a 100 µmol/l de ácido araquidónico se observa una respuesta monofásica o bifásica. Con 2-10 µmol/l de adrenalina se observa agregación bifásica. Una respuesta a una baja concentración de ristocetina (0,5 mg/ml) es anormal y constituye un dato característico de EVW tipo 2B (v. más adelante).

Interpretación y artefactos técnicos

Los volúmenes de PRP utilizados dependerán del agregómetro y de la cubeta empleados. Cuanto más pequeña la cubeta, más respuestas deben evaluarse con un volumen dado de PRP, pero más pobre será la calidad óptica (debido a una vía de luz más corta) y más probable será que se produzca la influencia de factores como restos o burbujas de aire.

Se debe tener cuidado en eliminar los hematíes y los granulocitos del PRP porque estas células interfieren con la transmisión de la luz y causan reducciones en los niveles de respuesta, lo que puede tomarse de forma equivocada como una agregación alterada. En enfermedades como la talasemia, en la que puede haber fragmentos y membranas de hematíes, éstas pueden eliminarse mediante una ulterior centrifugación del PRP a 150 g durante 2 min o después de que se haya producido el asentamiento de la mezcla. Si hay crioglobulinas presentes, pueden causar cambios en la transmisión como consecuencia de una agregación espontánea. El calentamiento del PRP a 37 °C durante 5 min permite que la agregación se desarrolle de forma normal.

El plasma lipémico puede causar problemas en el ajuste del agregómetro y las respuestas pueden comprimirse debido a la pequeña diferencia de luz transmitida entre el PRP y el PPP. Debe tenerse cuidado en la interpretación de los resultados de dichas muestras.

En la tabla 16.10 se muestra el patrón de respuestas en varios trastornos de la función plaquetaria. Para una discusión de la hiperagregabilidad, véase la página 394.

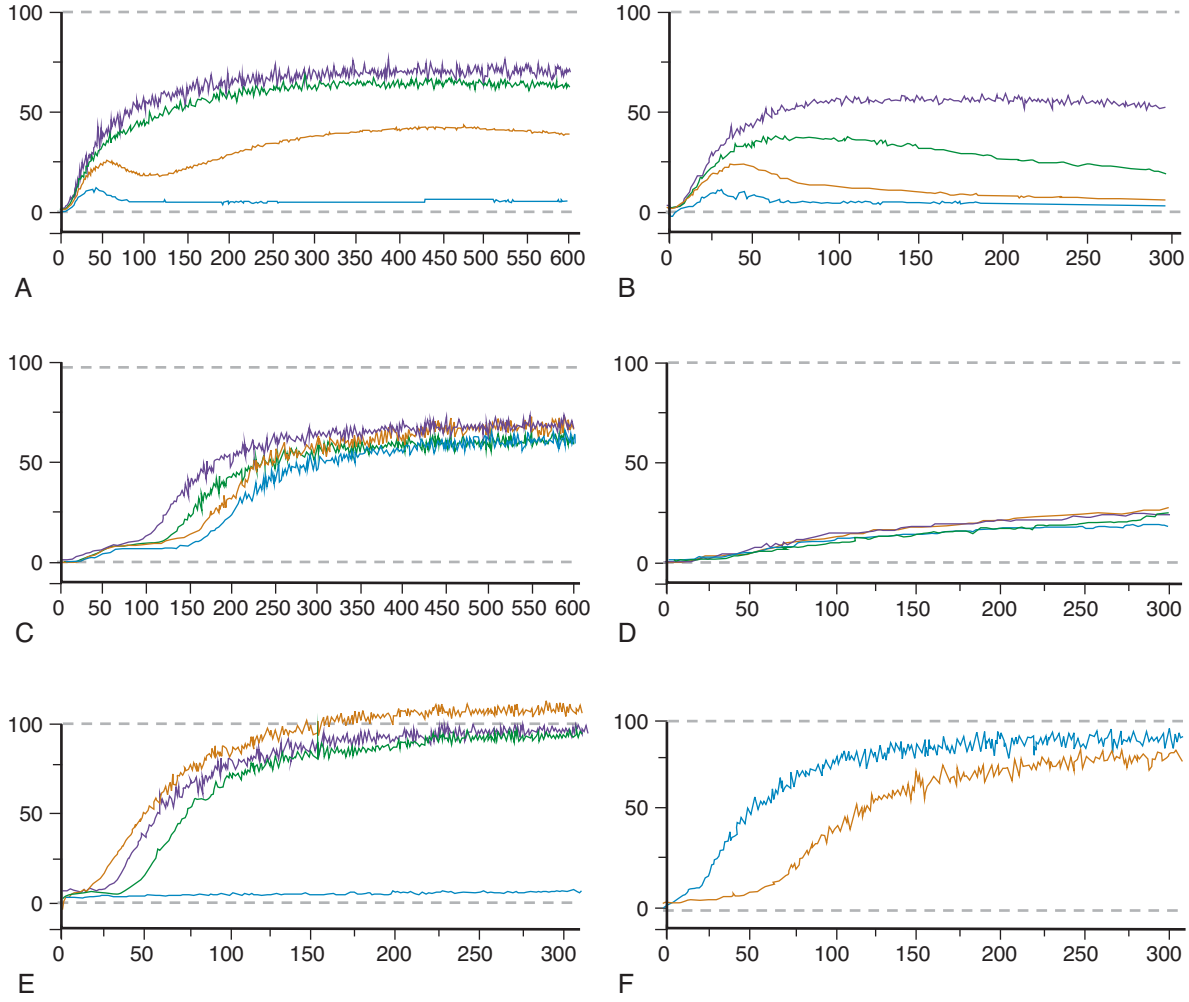


Figura 16.15. **Algunos ejemplos de análisis de agregación plaquetaria.**

A Normal B Anormal, respuestas a adenosina difosfato

Negro	0,5 µmol/l
Rojo	1,0 µmol/l
Verde	2,0 µmol/l
Azul	5,0 µmol/l

C Normal D Anormal, respuestas a la adrenalina

Negro	0,5 µmol/ml
Rojo	1,0 µmol/ml
Verde	2,0 µmol/ml
Azul	5,0 µmol/ml

E respuestas a colágeno y ristocetina

Negro	Bajas dosis de ristocetina	0,75 mg/ml
Rojo	Altas dosis de ristocetina	1,5 mg/ml
Verde	Colágeno a bajas dosis	5 µg/ml
Azul	Colágeno a altas dosis	10 µg/ml

F respuestas a ácido araquidónico

Negro	Altas dosis de ácido araquidónico	0,5 mg/ml
Rojo	Bajas dosis de ácido araquidónico	0,25 mg/ml

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 16.10. Diagnóstico diferencial de los trastornos de la función plaquetaria

Trastorno	Plaquetas		Agregación con					Comentarios/pruebas ulteriores
	Recuento	Tamaño	ADP	Col	Ri	AA	A23187	
Trombastenia	N	N	0	0	1	0	0	Expresión IIbIIIa
Síndrome de Bernard-Soulier	Bajo	Grande	N	N	0	N	N	Expresión de GpIb
Enfermedad por almacenamiento (δ)	N	N	1	R	1	1/0	R	Depósitos de ATP:ADP
Déficit de ciclooxigenasa	N	N	1/N	R	N	R	R	Responde a endoperóxido
Déficit en tromboxano sintetasa	N	N	1/N	R	N	R/0	N	
Ingesta de aspirina	N	N	1	R	N	R/0	N/R	Detener la toma de aspirina/AINE y reevaluar
Síndrome de Ehlers-Danlos	N	N	N	N	N	N	N	
Enfermedad de Von Willebrand	N	N	N	N	0/R	N	N	Ensayo de FVW:Ag y RiCoF

AA, ácido araquidónico; ADP, adenosina 5´-difosfatasa; AINE, antiinflamatorios no esteroideos; ATP, adenosina 5´trifosfatasa; A23187, ionóforo de calcio; Col, colágeno; FVW, factor de Von Willebrand; N, normal; R, reducido; Ri, ristocetina; RiCoF, cofactor de ristocetina; 0, ausente; 1 sólo onda primaria.
Obsérvese que también se han descrito otros muchos defectos, como los hallados en el albinismo oculocutáneo, el síndrome de Chediak-Higashi y el síndrome de las plaquetas grises.

En la tabla 16.11 se describen algunos problemas técnicos frecuentemente asociados con la agregación plaquetaria.

Estudios posteriores de la función plaquetaria

Si se observa un patrón de agregación anormal, es recomendable comprobar la evaluación en al menos una ocasión más. Si las pruebas de agregación son persistentemente anormales, y el paciente no está tomando fármacos o sustancias que se sepa que interfieren con la función plaquetaria, deben practicarse las siguientes pruebas (v. también fig. 16.13 y tabla 16.10):

1. Si se sospecha una trombastenia o un síndrome de Bernard-Soulier, es necesario un análisis de glucoproteínas de membrana, más fácil de realizar por citometría de flujo.
2. Si se sospecha una alteración en la liberación, deben utilizarse agonistas adicionales incluyendo análogos sintéticos de la endoperoxidasa e ionóforos cálcicos en una evaluación de la agregación. Los productos liberados pueden medirse directamente o de forma concurrente con la agregación en un lumiagregómetro[61]. Además, el contenido total de nucleótidos de adenina de las plaquetas y la cantidad liberada después de una estimulación máxima debe medirse utilizando una técnica de bioluminiscencia tipo «luciérnaga»[59,62].
3. Siempre que sea posible deben practicarse estudios por microscopia electrónica de la ultraestructura plaquetaria.
4. El análisis de factor VIII:C, FVW:Ag y el ensayo del cofactor de la ristocetina deben llevarse a cabo en todos los pacientes investigados por una alteración en la función plaquetaria que muestren una «aglutinación» con ristocetina anormal o en los cuales todas las pruebas de función plaquetaria sean normales.

PRUEBA DE SOLUBILIDAD DEL COÁGULO PARA EL ESTUDIO DEL FACTOR XIII

Principio

Los coágulos de fibrina formados en presencia de factor XIII y trombina son estables (como resultado del entrecruzamiento) durante al menos 1 h en 5 mol/l de urea, mientras que los coágulos formados en ausencia de factor XIII se disuelven rápidamente. Las encuestas sobre garantía de calidad en el Reino Unido han hallado que el test de solubilidad para el factor XIII es más sensible cuando la muestra es coagulada con trombina en vez de con calcio. No deben utilizarse preparaciones de trombina que contengan calcio. La utilización de urea 5 M, como se describió aquí, detectará un déficit de factor XIII de hasta 5 UI/dl. Un estudio sugirió que utilizando ácido acético al 2% como solución de lisis[63] puede detectarse un déficit de hasta el 10%.

Reactivos

PPP
Del paciente y un sujeto control.

Trombina
10 unidades de solución NIH.

Urea
5 mol/l en NaCl, 9 g/l.

Tabla 16.11. Factores técnicos que pueden influir en las pruebas de agregación plaquetaria

Centrifugación. A temperatura ambiente, no a 4 °C. Debe ser suficiente para eliminar los hematíes y los leucocitos pero no las plaquetas más grandes. Los hematíes residuales en el PRP pueden causar la impresión de una agregación incompleta
Tiempo. Durante 30 min después de la preparación del PRP, las plaquetas se muestran refractarias a los efectos de los agonistas. A continuación, se produce un progresivo aumento de la reactividad; más marcado desde las 2 h en adelante
Recuento plaquetario. Agregación lenta y débil observada con los recuentos plaquetarios por debajo de 150 o por encima de 400 × 10^9/l
pH < 7,7 inhibe la agregación; pH > 8,0 facilita la agregación
Velocidad de mezclado. Velocidades <800 rpm o >1.200 rpm enlentencen la agregación
Hematocrito. Un hematocrito >0,55 se asocia con menos agregación, especialmente en la fase secundaria debido al incremento de concentración de citrato en el PRP. Puede ser también difícil obtener suficiente PPP. Centrifugar dos veces puede ser de utilidad
Temperatura. Una temperatura <35 °C causa una disminución de la agregación excepto con dosis bajas de ADP, lo que puede potenciarla
Cubeta sucia. Puede causar una agregación plaquetaria espontánea o interferir con la óptica del sistema
Burbujas de aire en la cubeta. Causa importantes oscilaciones irregulares, incluso antes de la adición de agonistas
Ausencia de barra de agitación. Sin respuesta a cualquier agonista obtenido
PPP, plasma pobre en plaquetas; PRP, plasma rico en plaquetas.

Método

Por duplicado, se mezclan 0,2 ml del plasma del paciente con 0,2 ml de solución de trombina 10 unidades NIH en un tubo de prueba de cristal y se incuban a 37 °C durante 20 min. Montar un control con plasma normal de la misma forma. El plasma EDTA puede incluirse como un control negativo. Cada tubo se llena con aproximadamente 3 ml de solución de urea, sacando cuidadosamente el coágulo, y dejando en reposo a 37 °C durante 24 h. Inspeccionar cada tubo para comprobar la presencia de un coágulo a intervalos regulares.

Interpretación

El coágulo control, si es normal, no muestra signos de disolverse después de las 24 h. Sin embargo, en ausencia de factor XIII, el coágulo se habrá disuelto. El resultado de la prueba se considera normal si el hay coágulo y anormal si no lo hay. La prueba de solubilidad del coágulo tiene escasa sensibilidad y sólo puede detectar niveles por debajo de aproximadamente 5 UI/dl. La relación entre el nivel de factor XIII y una hemostasia adecuada es incierta, pero hay alguna evidencia de que los niveles de 5-40 UI/dl pueden también asociarse con sangrado. En casos de sospecha se dispone de los ensayos fotométrico y de ELISA de factor XIII para realizar valoraciones cuantitativas. Sin embargo, estos ensayos parecen tener poca reproducibilidad así que su papel todavía no está claro[63].

COAGULACIÓN INTRAVASCULAR DISEMINADA

El término CID incluye un amplio número de fenómenos clínicos de diversos grados de gravedad. Algunas veces también se ha denominado coagulopatía por consumo debido a que su rasgo característico es la activación excesiva y generalizada del mecanismo de la coagulación con el subsiguiente consumo de factores de coagulación e inhibidores, con pérdida de los mecanismos de regulación normales.

En los pacientes con CID aguda esto suele originar una desfibrinación y una diátesis hemorrágica. En algunas situaciones, sin embargo, la activación puede ser menos marcada y parcialmente compensada produciéndose una tendencia a la trombosis. Este último fenómeno es típico de la activación de la coagulación observada en asociación con enfermedades malignas y puede asociarse con tiempos de coagulación ligeramente acortados.

El diagnóstico de CID aguda puede realizarse generalmente a partir de las alteraciones de las pruebas de detección básicas de primera línea descritas previamente en contexto clínico adecuado. De forma característica, el TP, el TTPA y el TT se prolongan, y la concentración de fibrinógeno está marcadamente reducida. En asociación con el consumo de factores de coagulación responsables de estas alteraciones hay una caída en el recuento plaquetario también como resultado del consumo. Conforme la CID se desarrolla, la disminución en el recuento plaquetario es un signo precoz mientras que la hipofibrinogenemia puede ser relativamente tardía. Esto la distingue de la coagulopatía por dilución en la que suele darse la situación opuesta. Concomitantemente hay activación del sistema fibrinolítico y un incremento de los productos de degradación de la fibrina y el fibrinógeno circulantes. Estas alteraciones constituyen la base del diagnóstico de la CID. Se dispone de una guía diagnóstica pero es más útil para los ensayos clínicos que para la práctica de rutina[64]. No suelen realizarse pruebas más elaboradas, pero pueden demostrar reducciones en factores de la coagulación individuales, antitrombina y antiplasmina y niveles incrementados de complejos trombina-antitrombina y plasmina-antiplasmina y de péptidos de activación como protrombina F1+2. Algunos analizadores proporcionan un análisis en forma ondular que puede detectar estadios precoces de la CID (v. pág. 371)[17].

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Detección de productos de degradación de fibrinógeno/fibrina utilizando un método de aglutinación en látex[65]

Principio

Una suspensión de partículas de látex es sensibilizada con anticuerpos específicos para los fragmentos D y E purificados de los PDF. La suspensión se mezcla sobre una placa de cristal con una dilución del suero que se desea estudiar. La agregación indica la presencia de PDF en la muestra. Mediante la evaluación de diferentes diluciones de la muestra desconocida, puede llevarse a cabo un ensayo semicuantitativo.

Reactivos

Sangre venosa

Recogida en un tubo especial (proporcionado junto con el equipo) que contiene tanto el antifibrinolítico como la trombina.

Equipo de prueba

(Oxoid Ltd).

Controles positivos y negativos

Proporcionados por el fabricante.

Tampón de glicina

Parte del equipo.

Método

Dejar que el tubo con sangre permanezca a 37 °C hasta que empiece la retracción del coágulo. Entonces centrifugar el tubo y retirar el suero problema. Es importante que el fibrinógeno de la muestra esté completamente coagulado o éste se detectará en la prueba. Esto puede ser un problema en presencia de heparina, en una disfibrinogenemia o con altos niveles de PDF. En estos casos, la adición de unas pocas gotas de 100 u (NIH)/ml de trombina potenciará la coagulación de la muestra.

Hacer diluciones 1 en 5 y 1 en 20 de suero en tampón de glicina. Mezclar 1 gota de cada dilución del suero con 1 gota de suspensión de látex sobre una placa de cristal. Balancear cuidadosamente la placa durante 2 min mientras se observa si aparece aglutinación macroscópica. Si se observa una reacción positiva en la dilución más alta, hacer diluciones dobles de la dilución 1:20 hasta que no se observe la aglutinación macroscópica.

Interpretación

La aglutinación con dilución de 1:5 del suero indica una concentración de PDF superior a 10 μg/ml; la aglutinación en una dilución 1:20 indica PDF en concentraciones superiores a 40 μg/ml.

Intervalo normal

Los sujetos sanos tienen una concentración de PDF que está por debajo de 10 μg/ml. Concentraciones entre 10 y 40 μg/ml se hallan en diversas condiciones como el tromboembolismo venoso agudo, el infarto agudo de miocardio y la neumonía grave, así como tras cirugía mayor. Se observan altos niveles en la fibrinólisis sistémica asociada a la CID y en la terapia trombolítica con estreptocinasa.

Pruebas de detección de monómeros de fibrina[66-68]

Principio

Cuando la trombina actúa sobre el fibrinógeno, algunos de los monómeros no polimerizan pero dan lugar a complejos solubles con el fibrinógeno plasmático y los PDF. Estos complejos pueden ponerse de manifiesto *in vitro* mediante las pruebas del etanol o del sulfato de protamina.

Reactivos

PPP

Del paciente y un control.

Control positivo

Éste se prepara añadiendo 0,1 ml de trombina (0,2 NIH unidades/ml) a 0,9 ml de plasma control e incubando a 37 °C durante 30 min. Las mallas de fibrina formadas durante la incubación se eliminan mediante centrifugación.

Sulfato de protamina

1% (10 g/l).

Etanol

50% (v/v) en agua.

Método

Prueba de sulfato de protamina. Añadir 0,05 ml de sulfato de protamina a 0,5 ml de plasma del paciente y a 0,5 ml de plasma del control positivo. Incubar sin alterar a 37 °C durante 30 min. Un resultado positivo viene indicado por la formación de una fina red de fibrina o de mallas de fibrina. La presencia sólo de material amorfo se considera un resultado negativo.

Prueba de gelificación con etanol. Añadir 0,15 ml de etanol a 0,5 ml del plasma del paciente y a 0,5 ml del plasma del control positivo a temperatura ambiente (unos 20 °C). Después de una agitación suave, revisar los tubos a intervalos de 1 min. La formación de un gel definido en 3 min se considera un resultado positivo.

Interpretación

Las pruebas de gelificación positivas se encuentran en los siguientes casos:

1. Estadios precoces de la CID aguda.
2. Después de cirugía mayor.
3. Enfermedad inflamatoria grave, en especial en la neumonía lobar.
4. Enfermedad hepática.

Detección de los dímeros-D de fibrina entrecruzados utilizando un método de aglutinación en látex

Principio

El método de aglutinación en látex para detectar dímeros-D de fibrina entrecruzada es idéntico a la prueba previamente descrita para los PDF, pero en este caso las partículas de látex se recubren con un anticuerpo monoclonal dirigido de forma específica contra los dímeros-D de fibrina en plasma o suero humano. Debido a que no hay reacción con el fibrinógeno, no hay necesidad de eliminar el suero y las determinaciones pueden realizarse en muestras de plasma.

Reactivos

Varios fabricantes han comercializado equipos para la determinación de dímeros-D. Suelen contener la suspensión de látex, el tampón de dilución y controles positivos y negativos.

Método

Se debe seguir el protocolo del fabricante. El plasma no diluido se mezcla con una gota de la suspensión de látex en una lámina de cristal y dicha lámina se balancea suavemente durante el tiempo recomendado en el equipo. Si se observa aglutinación macroscópica, se realizan tantas diluciones como sea necesario hasta que la aglutinación deja de observarse.

Interpretación

La aglutinación con plasma no diluido indica una concentración de dímeros-D superior a 200 mg/l. El nivel de dímero-D puede cuantificarse multiplicando el recíproco por la dilución mayor que muestre un resultado positivo por 200 para dar un valor en mg/l.

Intervalo normal

Los niveles plasmáticos en sujetos normales son inferiores a los 200 mg/l. Ha habido muchos estudios sobre si los análisis de dímero-D son una forma útil de excluir trombosis, pero naturalmente existe una relación inversa entre sensibilidad y especificidad, especialmente cuando se requiere un tiempo de procesamiento rápido. La falta de un estándar internacional y la pobre correlación entre equipos implica que la utilización de equipos para este objeto deba validarse individualmente. Se dispone de varios equipos que utilizan métodos ELISA para la detección de dímeros-D y que presentan mayor sensibilidad, pero son más engorrosos de realizar. Las pruebas de látex que utilizan analizadores automatizados pueden proporcionar una solución aceptable[69]. Estas pruebas se han incorporado recientemente a las guías clínicas de acuerdo con su sensibilidad[70,71].

ESTUDIO DE PORTADORES DE UN DÉFICIT O DEFECTO CONGÉNITO DE LA COAGULACIÓN[72,73]

La detección de portadores es importante en el consejo genético, y el diagnóstico antenatal puede permitir que se considere la terminación del embarazo con un feto gravemente afectado y pueda optimizarse el manejo del embarazo y del parto. La información de valor en la detección de portadores se deriva de los estudios familiares, investigaciones fenotípicas y determinación del genotipo.

Estudios familiares

Las hemofilias A y B (déficit de factor VIII y factor IX) se heredan a través de genes ligados al cromosoma X. Esto significa que todos los hijos de una persona con hemofilia serán normales y todas sus hijas serán portadoras. El hijo de un portador tiene un riesgo del 0,5 de estar afectado si es un niño y de 0,5 de ser portadora si se trata de una niña. Los otros defectos en factores de la coagulación se heredan como rasgos autosómicos. Los heterocigotos poseen aproximadamente la mitad de la concentración normal del factor de coagulación y generalmente no presentan manifestación clínica, sólo los homocigotos tienen una diátesis hemorrágica significativa. El factor XI es una excepción a esta regla, dado que los heterocigotos algunas veces sangran excesivamente después de un traumatismo o de una cirugía. La forma más frecuente de EVW (tipo 1) se hereda como rasgo autosómico dominante.

En los defectos de factores de la coagulación es importante el estudio familiar detallado para establecer la naturaleza real del defecto y su gravedad. Los pacientes suelen describir cualquier tendencia hemorrágica familiar como hemofilia y, por tanto, es esencial probar el defecto exacto en cada nuevo paciente y en su familia. En la endogamia la probabilidad de que aparezcan homocigotos aumenta.

Investigación del fenotipo

Teóricamente se podría esperar que la concentración del factor de coagulación afectado en el heterocigoto o en el portador sea aproximadamente la mitad de lo normal. Sin embargo, en el caso del factor VIII y del factor IX, esto se ve complicado por el fenómeno de la inactivación del cromosoma X (ICX). Las mujeres poseen dos cromosomas X, pero en cada célula sólo uno de estos dos es utilizado y el otro es en gran medida inactivado. En cada célula la selección de qué cromosoma X es el activo es esencialmente aleatoria y varía en forma de distribución normal. Por tanto, en los portadores de hemofilia A o B, el nivel de factor VIII o IX también varía sobre una distribución aproximadamente normal dependiendo de las proporciones de cromosomas X normales y hemofílicos que están siendo activos. Como consecuencia, algunos portadores pueden presentar un nivel completamente normal de factor VIII o factor IX y otros pueden presentar déficits significativos. Esta inactivación cromosómica es algunas veces denominada «lyonización» debido a Mary Lyon, quien fue la primera en describirla. En el caso del factor VIII, el nivel de FVW ha

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

demostrado algunas veces ser una determinación útil. La proporción de VIII:C con respecto al FVW:Ag se reduce en la mayoría de los portadores y puede utilizarse junto con la historia familiar para determinar la probabilidad de que un sujeto sea un portador. Estas estimaciones se ven todavía más complicadas por el hecho de que el factor VIII actúa como reactante de fase aguda y puede estar elevado por un número de factores intercurrentes incluyendo embarazo, estrés y ejercicio.

Cuando se ha realizado un estudio familiar detallado es posible establecer las probabilidades estadísticas de heredar un defecto de la coagulación. Para una revisión sobre el tema, véase Graham y cols.[72]

Asignación del genotipo

El advenimiento de la biología molecular y de la clonación de muchos de los genes de los factores de coagulación, especialmente de los factores VIII y IX, han revolucionado la aproximación de la determinación del estado de portador. El descubrimiento de polimorfismos genéticos, algunos de los cuales son multialélicos, dentro de los genes de los factores de coagulación ha significado que en la mayoría de las familias los genes afectados puedan ser seguidos y el estado de portador pueda determinarse con un alto grado de probabilidad. Cada vez más, el defecto genético puede identificarse en sí mismo, resultando en una asignación genotípica inequívoca en cada miembro de la familia. Esto debe considerarse como el estándar de atención, eliminando la ambigüedad y la incertidumbre de los métodos anteriores. Las técnicas requeridas para estos análisis se describen en el capítulo 21. El problema de la determinación de portador y diagnóstico prenatal ha sido tratado en una revisión global de la OMS/WFH[73]. Aunque las opciones para las familias afectadas crecen[74], aproximadamente un tercio de los casos surgen sin historia familiar precedente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, et al 1998 Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. Blood 91:3527–3561.
2. Frank PG, Woodman SE, Park DS, et al 2003 Caveolin, caveolae, and endothelial cell function. Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology 23:1161–1168.
3. Ruggeri ZM 2003 Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. Journal of Thrombosis & Haemostasis 1:1335–1342.
4. May AE, Neumann FJ, Preissner KT 1999 The relevance of blood cell-vessel wall adhesive interactions for vascular thrombotic disease. Thrombosis & Haemostasis 82:962–970.
5. Ruggeri ZM 1997 Mechanisms initiating platelet thrombus formation [published erratum appears in Thrombosis & Haemostasis 1997 Oct;78(4):1304] [see comments]. Thrombosis & Haemostasis 78:611–616.
6. Nurden AT 1999 Inherited abnormalities of platelets. Thrombosis & Haemostasis 82:468–480.
7. George J 2000 Platelets. Lancet 355:1531–1539.
8. Mann KG 1999 Biochemistry and physiology of blood coagulation. Thrombosis & Haemostasis 82:165–174.
9. Colman R, Schmaier A 1997 Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive and proinflammatory attributes. Blood 90:3819–3843.
10. Mosesson MW 1998 Fibrinogen structure and fibrin clot assembly. Seminars in Thrombosis and Hemostasis 24: 169–174.
11. Matsuda M, Sugo T, Yoshida N, et al 1999 Structure and function of fibrinogen: insights from dysfibrinogens. Thrombosis & Haemostasis 82:283–290.
12. van Boven HH, Lane DA.1997 Antithrombin and its inherited deficiency states. Seminars in Hematology 34:188–204.
13. Dahlback B 1997 Factor V and protein S as cofactors to activated protein C. Haematologica 82:91–95.
14. Collen D 1999 The plasminogen (fibrinolytic) system. Thrombosis & Haemostasis 82:259–270.
15. Hutton RA 1987 Chromogenic substrates in haemostasis. Blood Reviews 1:201–206.
16. Toh CH 1999 APTT revisited: detecting dysfunction in the hemostatic system through waveform analysis. Thrombosis & Haemostasis:684–687.
17. Toh CH, Samis J, Downey C, et al 2002 Biphasic transmittance waveform in the APTT coagulation assay is due to the formation of a Ca(++)-dependent complex of C-reactive protein with very-low-density lipoprotein and is a novel marker of impending disseminated intravascular coagulation. Blood 100:2522–2529.
18. Quick AJ 1973 Quick on "Quick agglutination venostasis" bleeding time technique. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 26:1812.
19. Miller GJ, Seghatchian MJ, Walter SJ, et al 1986 An association between the factor VII coagulant activity and thrombin activity induced by surface/cold exposure of normal human plasma. British Journal of Haematology 62:379–384.
20. Palareti G, Maccaferri M, Manotti C, et al 1991 Fibrinogen assays: a collaborative study of six different methods. C.I.S.M.E.L. Comitato Italiano per la Standardizzazione dei Metodi in Ematologia e Laboratorio. Clinical Chemistry 37:714–719.
21. Lawrie AS, McDonald SJ, Purdy G, et al 1998 Prothrombin time derived fibrinogen determination on Sysmex CA-6000. Journal of Clinical Pathology 51:462–466.
22. De Cristofaro R, Landolfi R 1998 Measurement of plasma fibrinogen concentration by the prothrombin-time-derived method: applicability and limitations. Blood Coagulation & Fibrinolysis 9:251–259.
23. Mackie IJ, Kitchen S, Machin SJ, et al 2003 Guidelines on fibrinogen assays. British Journal of Haematology 121: 396–404.
24. Clauss A.1957 Rapid physiological coagulation method in determination of fibrinogen. Acta Haematologica (Basel) 17:237.
25. Mackie J, Lawrie AS, Kitchen S, et al 2002 A performance evaluation of commercial fibrinogen reference preparations and assays for Clauss and PT-derived fibrinogen. Thrombosis & Haemostasis 87:997–1005.
26. Jespersen J, Sidelmann J 1982 A study of the conditions and accuracy of the thrombin time assay of plasma fibrinogen. Acta Haematologic 67:2–7.
27. Funk C, Gmur J, Herold R, et al 1971 Reptilase-R—a new reagent in blood coagulation. British Journal of Haematology 21:43–52.

28. Williams KN, Davidson JM, Ingram GI 1975 A computer program for the analysis of parallel-line bioassays of clotting factors. British Journal of Haematology 31: 13–23.
29. Kirkwood TB, Snape TJ 1980 Biometric principles in clotting and clot lysis assays. Clin Laboratory Haematology 2:155–167.
30. Koster T, Blann A, Briet E, et al 1995 Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep vein thrombosis. Lancet 345:152–155.
31. Jorieux S, Tuley EA, Gaucher C, et al 1992 The mutation Arg (53)—Trp causes von Willebrand disease Normandy by abolishing binding to factor VIII: studies with recombinant von Willebrand factor. Blood 79:563–567.
32. Pipe SW, Eickhorst AN, McKinley SH, et al 1999 Mild hemophilia A caused by increased rate of factor VIII A2 subunit dissociation: evidence for nonproteolytic inactivation of factor VIIIa in vivo. Blood 93:176–183.
33. Keeling DM, Sukhu K, Kemball Cook G, et al 1999 Diagnostic importance of the two-stage factor VIII:C assay demonstrated by a case of mild haemophilia associated with His1954—>Leu substitution in the factor VIII A3 domain. British Journal of Haematology 105:1123–1126.
34. White GC, Roberts HR 1996 The treatment of factor VIII inhibitors: a general overview. Vox Sanguinis 70 (suppl 1):19–23.
35. Sukhu K, Harrison P, Keeling D 2003 Factor VIII assays in haemophilia a patients treated with ReFacto. British Journal of Haematology 121:379–380.
36. Barrowcliffe TW, Raut S, Hubbard AR 1998 Discrepancies in potency assessment of recombinant FVIII concentrates. Haemophilia 4:634–640.
37. Barrowcliffe TW 2003 Standardization of FVIII & FIX assays. Haemophilia 9:397–402.
38. Kasper CK 1984 Measurement of factor VIII inhibitors. Progress in Clinical Biological Research 150:87–98.
39. Galli M, Barbui T 1999 Antiprothrombin antibodies: detection and clinical significance in the antiphospholipid syndrome. Blood 93:2149–2157.
40. Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, et al 1995 The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. Thrombosis & Haemostasis 73:247–251.
41. Gaffney PJ, Wong MY 1992 Collaborative study of a proposed international standard for plasma fibrinogen measurement. Thrombosis & Haemostasis 68:428–432.
42. Haverkate F, Samama M 1995 Familial dysfibrinogenemia and thrombophilia: report on a study of the SSC Subcommittee on Fibrinogen. Thrombosis & Haemostasis 73: 151–161.
43. Pepin M, Schwarze U, Superti Furga A, et al 2000 Clinical and genetic features of Ehlers-Danlos syndrome type IV, the vascular type [see comments]. New England Journal of Medicine 342:673–680.
44. Rodgers RP, Levin J 1990 A critical reappraisal of the bleeding time. Seminars in Thrombosis & Hemostasis 16:1–20.
45. Mielke CH, Jr, Kaneshiro MM, Maher IA, et al 1969 The standardized normal Ivy bleeding time and its prolongation by aspirin. Blood 34:204–215.
46. Ivy A, Nelson D, Bucher G 1940 The standardization of certain factors in the cutaneous 'venostasis' bleeding time technique. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 26: 1812.
46a. Bain BJ, Forster T 1980 A sex difference in the bleeding time. Thrombosis and Haemostasis 43:131–132.
47. Fressinaud E, Veyradier A, Truchaud F, et al 1998 Screening for von Willebrand disease with a new analyzer using high shear stress: a study of 60 cases. Blood 91:1325–1331.
48. Cattaneo M, Federici AB, Lecchi A, et al 1999 Evaluation of the PFA-100 system in the diagnosis and therapeutic monitoring of patients with von Willebrand disease. Thrombosis & Haemostasis 82:35–39.
49. Quiroga T, Goycoolea M, Munoz B, et al 2004 Template bleeding time and PFA-100 have low sensitivity to screen patients with hereditary mucocutaneous hemorrhages: comparative study in 148 patients. J Thrombosis & Haemostasis 2:892–898.
50. Sadler JE, Matsushita T, Dong Z, et al 1995 Molecular mechanism and classification of von Willebrand disease. Thrombosis & Haemostasis 74:161–166.
51. Sadler JE 1994 A revised classification of von Willebrand disease: for the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Thrombosis & Haemostasis 71:520–525.
52. Laffan M, Brown SA, Collins PW, et al 2004 The diagnosis of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. Haemophilia:199–217.
53. Sadler JE 2003 Von Willebrand disease type 1: a diagnosis in search of a disease. Blood 101:2089–2093.
54. Bartlett A, Dormandy KM, Hawkey CM, et al 1976 Factor-VIII-related antigen: measurement by enzyme immunoassay. British Medical Journal 1:994–996.
55. Macfarlane DE, Stibbe J, Kirby EP, et al 1975 Letter: A method for assaying von Willebrand factor (ristocetin cofactor). Thrombosis Diatheses Haemorrhage 34:306–308.
56. Favaloro EJ 2002 A duplex issue: (i) time to re-appraise the diagnosis and classification of von Willebrand disorder, and (ii) clarification of the roles of von Willebrand factor collagen binding and ristocetin cofactor activity assays. Haemophilia 8:828–831.
57. Favaloro EJ 2000 Collagen binding assay for von Willebrand factor (VWF:CBA): detection of von Willebrands Disease (VWD), and discrimination of VWD subtypes, depends on collagen source. Thrombosis & Haemostasis 83:127–135.
58. Enayat MS, Hill FG 1983 Analysis of the complexity of the multimeric structure of factor VIII related antigen/von Willebrand protein using a modified electrophoretic technique. Journal of Clinical Pathology 36:915–919.
59. BCSH.1988 Guidelines on platelet function testing. The British Society for Haematology BCSH Haemostasis and Thrombosis Task Force. Journal of Clinical Pathology 41:1322–1330.
60. Yardumian DA, Mackie IJ, Machin SJ 1986 Laboratory investigation of platelet function: a review of methodology. Journal of Clinical Pathology 39:701–712.
61. Leon C, Vial C, Gachet C, et al 1999 The P2Y1 receptor is normal in a patient presenting a severe deficiency of ADP-induced platelet aggregation. Thrombosis & Haemostasis 81:775–781.
62. David JL, Herion F 1972 Assay of platelet ATP and ADP by the luciferase method: some theoretical and practical aspects. Adv Exp Med Biol 34:341–354.
63. Jennings I, Kitchen S, Woods TA, et al 2003 Problems relating to the laboratory diagnosis of factor XIII deficiency: a

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

UK NEQAS study. Journal of Thrombosis & Haemostasis 1:2603–2608.
64. Taylor FB, Jr, Toh CH, Hoots WK, et al 2001 Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. Thrombosis & Haemostasis 86:1327–1330.
65. Garvey MB, Black JM 1972 The detection of fibrinogen-fibrin degradation products by means of a new antibody-coated latex particle. Journal of Clinical Pathology 25: 680–682.
66. Lipinski B, Worowski K.1968 Detection of soluble fibrin monomer complexes in blood by means of protamine sulphate test. Thrombosis Diatheses Haemorrhage 20:44–49.
67. Breen FA, Jr, Tullis JL 1968 Ethanol gelation: a rapid screening test for intravascular coagulation. Annals of Internal Medicine 69:1197–1206.
68. Breen FA, Jr, Tullis JL 1969 Ethanol gelation test improved. Annals of Internal Medicine 71:433–434.
69. Keeling DM, Wright M, Baker P, et al 1999 D-dimer for the exclusion of venous thromboembolism: comparison of a new automated latex particle immunoassay (MDA D-dimer) with an established enzyme-linked fluorescent assay (VIDAS D-dimer). Clinical Laboratory Haematology 21:359–362.
70. Keeling DM, Mackie IJ, Moody A, et al 2004 The diagnosis of deep vein thrombosis in symptomatic outpatients and the potential for clinical assessment and D-dimer assays to reduce the need for diagnostic imaging. British Journal of Haematology 124:15–25.
71. British Thoracic Society Standards of Care Committee Pulmonary Embolism Guideline Development G 2003 British Thoracic Society guidelines for the management of suspected acute pulmonary embolism. [See comment]. Thorax 58:470–483.
72. Graham J, Elston R, Barrrow E, et al 1982 The Hemophilias: statistical methods for carrier detection in hemophilias. Methods in Hematology 5:156.
73. Peake IR, Lillicrap DP, Boulyjenkov V, et al 1993 Report of a joint WHO/WFH meeting on the control of haemophilia: carrier detection and prenatal diagnosis [published erratum appears in Blood Coagulation & Fibrinolysis 1994] Blood Coagulation & Fibrinolysis 4:313–444.
74. Oyesiku JO, Turner CF 2002 Reproductive choices for couples with haemophilia. Haemophilia 8:348–352.
75. Ingram GIC, Hills M 1976 The prothrombin time test: effect of varying citrate concentration. Thrombosis and Haemostasis 36:230–232.

17 Investigación de la tendencia trombótica

Mike Laffan y Richard Manning

Introducción a la trombofilia 379
Pruebas de la presencia de anticoagulante lúpico 380
- Tiempo de coagulación del caolín 381
- Tiempo del veneno de la víbora de Russell diluido 381
- Prueba de neutralización plaquetaria 382
- Prueba de inhibición de la tromboplastina diluida 383
- Ratio textarina/ecarina 383
- Análisis de anticardiolipina 384

Estudio de los estados trombóticos hereditarios 384
- Antitrombina 384
- Medición de la antitrombina (AT) utilizando un análisis cromogénico 384

Estudio del déficit de proteína C (PC) 385
- Análisis de la proteína C 385
- Análisis de la proteína S (PS) 386
- Resistencia a la proteína C activada 388
- Elevación de protrombina, factor VIII y otros factores 389
- Análisis del cofactor II de la heparina 389

Sistema fibrinolítico 390
- Estudio de la sospecha de disfibrinogenemia 390
- Estudio del sistema fibrinolítico: consideraciones generales 390
- Estudio de la sospecha de un defecto o déficit del plasminógeno 390
- Estudio del «potencial fibrinolítico» 391
- Tiempo de lisis de las euglobulinas 391
- Lisis de las placas de fibrina 391
- Prueba de oclusión venosa 392
- Análisis amidolítico del activador tisular del plasminógeno 392
- Análisis del inhibidor del activador del plasminógeno 393
- Análisis del antígeno inhibidor del activador del plasminógeno 393
- Análisis amidolítico del inhibidor de la plasmina (α_2 antiplasmina) 393

«Hiperreactividad» plaquetaria y activación 394
- Activación plaquetaria: citometría de flujo 394

Homocisteína 394
Marcadores de la activación de la coagulación 395
Factor VIIa activado 395
Prueba global de coagulación 395

INTRODUCCIÓN A LA TROMBOFILIA

Es frecuente que se lleven a cabo numerosos estudios para excluir una tendencia trombótica adquirida o heredada en neonatos, niños y adultos jóvenes que desarrollan trombosis venosas, en aquellos que tienen una historia familiar relevante en estos sucesos, o que tienen trombosis en una ubicación poco habitual, y en individuos de todas las edades con episodios recurrentes de tromboembolismo. Estos estudios se centran por lo general en las trombosis venosas, pero también se estudian algunos sucesos arteriales sin explicación, especialmente en individuos jóvenes. Por lo general, la contribución de los factores hereditarios aquí descritos es menos evidente para la trombosis arterial que para la venosa, porque su efecto se suele ocultar detrás de la arteriosclerosis. Se debe recordar que muchas trombosis son casi por completo el resultado de factores circunstanciales, como traumatismos, operaciones y respuesta inflamatoria de fase aguda. En estos casos no suele ser necesario seguir haciendo más estudios de coagulación.

En este capítulo se presentan en primer lugar diversos estudios para diagnosticar o excluir una tendencia trombótica adquirida, seguidos de una batería de pruebas simplificadas, que son necesarias para establecer el diagnóstico de las «trombofilias» hereditarias más importantes. Aunque el número de factores de la coagulación que se sabe que contribuyen a la tendencia trombótica ha aumentado mucho en los últimos años, aún quedan muchos factores por identificar. Por lo tanto, el fracaso en la detección de los rasgos descritos no implica que el riesgo individual de trombosis sea normal. Las tendencias trombóticas adquiridas son frecuentes y aparecen en numerosas ocasiones. El gran número de rasgos identificados, a menudo con un riesgo relativo asociado pequeño, hace que su utilidad individual sea igualmente pequeña. Hasta que no se comprendan mejor las interacciones entre estos factores tan numerosos, la historia clínica deberá ser el factor dominante en el tratamiento clínico. El British Committee for Standards in Haematology ha publicado una serie de guías en la investigación y el manejo de la trombofilia[1]. En este

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

capítulo se describe un resumen de las investigaciones en diferentes circunstancias; dicho resumen se muestra en la figura 17.1.

PRUEBAS DE LA PRESENCIA DE ANTICOAGULANTE LÚPICO

El anticoagulante lúpico (ACL) es un autoanticuerpo adquirido presente en varias alteraciones autoinmunitarias y a veces también en individuos sanos[2]. Los ACL son inmunoglobulinas que se unen a los complejos de varias proteínas con fosfolípidos activos en la coagulación y, por tanto, prolongan el tiempo de coagulación de las pruebas que dependen del fosfolípido, como el tiempo de protrombina (TP) o el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA). El nombre «anticoagulante» es confuso, porque los pacientes no tienen tendencia al sangrado. En lugar de eso, hay una clara asociación con tromboembolismos venosos recurrentes, accidentes cerebrovasculares y otros eventos arteriales y, en mujeres, con abortos recurrentes, pérdidas fetales y otras complicaciones del embarazo[3]. Por tanto, se deberían llevar a cabo estudios acerca de la presencia de ACL en todos los individuos jóvenes con trombosis arteriales o venosas sin explicación y, también, en mujeres con pérdidas de embarazos tempranas o tardías recurrentes. La detección de un ACL no debería excluir posteriores investigaciones de otros defectos protrombóticos, tales como la coexistencia de déficit de antitrombina (AT), déficit de proteína C (PC), déficit de proteína S (PS), y factor V de Leiden (FVL), aunque puede interferir en estas pruebas.

La presencia de un ACL se puede detectar mediante pruebas básicas de coagulación, según los reactivos y los métodos utilizados, así como por la potencia y la avidez del anticuerpo. Sin embargo, la sensibilidad tanto del TTPA como el TP al ACL varía considerablemente, de manera que estas pruebas pueden ser normales y, si hay sospecha clínica, siempre se deben realizar pruebas específicas[4]. La prueba no modificada de la resistencia de la PC activada (v. más adelante) también es sensible a la presencia de ACL.

Los pacientes con un ACL pueden mostrar otras alteraciones, incluyendo trombocitopenia, una prueba de antiglobulina directa positiva y una prueba de factor antinuclear positivo. En algunos casos aislados también se encuentran anticuerpos específicos contra los factores de la coagulación. Estos pacientes pueden tener cierta tendencia al sangrado. Las pruebas específicas más habituales son las siguientes:

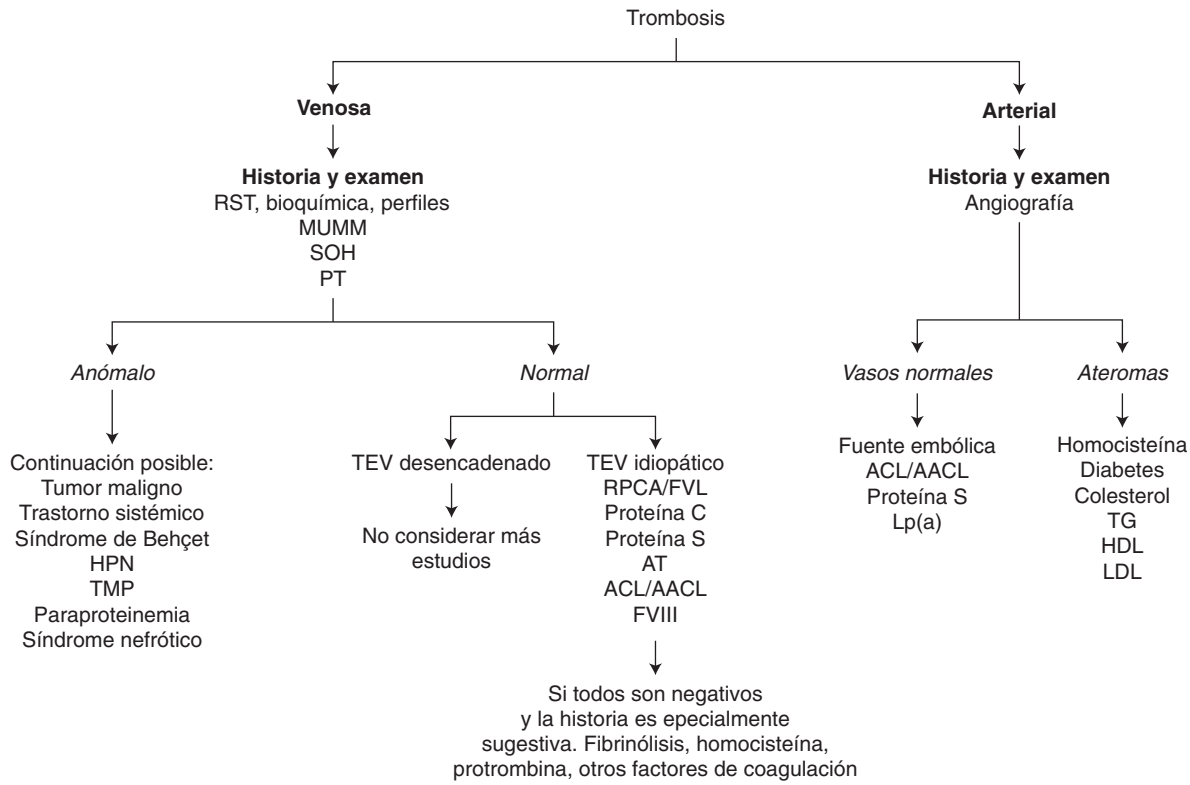


Figura 17.1. Estudios utilizados en el diagnóstico de trombosis. AACL, anticuerpo anticardiolipina; ACL, anticoagulante lúpico; AT, antitrombina; FVL, factor V de Leiden; HDL, lipoproteínas de alta densidad; HPN, hemoglobinuria paroxística nocturna; LDL, lipoproteínas de baja densidad; Lp(a), lipoproteína (a); MUMM, muestra urinaria en el momento medio de la micción; PT, placa de tórax; RPCA, resistencia a la proteína C activada; RST, recuento de sangre total; SOH, sangre oculta en heces; TEV, tromboembolismo venoso; TG, triglicéridos; TMP, trastornos mieloproliferativos.

1. Tiempo del veneno de la víbora de Russell diluido, junto con la prueba de neutralización plaquetaria.
2. Tiempo de coagulación del caolín (TCC).
3. Tiempo de inhibición de la tromboplastina tisular.

Es esencial que todas las muestras de plasma para las pruebas de ACL estén tan libres de plaquetas como sea posible. Esto se logra mediante varias centrifugaciones del plasma a 2.000 g, o pasando el plasma en estudio a través de un microfiltro de 0,2 µm a presión, utilizando una jeringuilla. Se debe llegar a un recuento de plaquetas inferior a 10×10^9/l. El plasma se centrifuga a temperatura ambiente para activar la agregación plaquetaria, porque las microvesículas plaquetarias también pueden invalidar la prueba.

Se han publicado guías para el estudio del síndrome antifosfolípido y para la detección de ACL[5].

Tiempo de coagulación del caolín

Principio

Cuando se realiza una TTPA en ausencia de un reactivo que sustituya a las plaquetas, éste es particularmente sensible a los ACL. Si la prueba se lleva a cabo en un determinado rango de mezclas de plasma normal y del paciente, se obtienen diferentes patrones de respuesta, que indican la presencia de ACL, el déficit de uno o más factores de coagulación o el efecto del «cofactor lúpico».

Hay equipos disponibles en el mercado basados en el TCC[6], como el Kaoclot (Gradipore Ltd.). Este método emplea una solución de caolín coloidal de baja turbidez, haciendo que este reactivo sea lento a la hora de fijarse y, por tanto, útil para analizadores de la coagulación automatizados. El Kaoclot muestra una alta sensibilidad a los ACL, pero no es apropiado para pacientes que sigan un tratamiento con heparina.

Reactivos

Caolín. 20 mg/ml en tampón Tris, pH 7,4. En algunos analizadores automáticos es necesario reducir la concentración a 5 mg/ml (v. pág. 343).

Plasma pobre en plaquetas normales. Disminuido en plaquetas mediante una segunda centrifugación o una microfiltración.

Plasma del paciente. También libre de plaquetas.

$CaCl_2$. 0,025 mol/l.

Método

Mezclar el plasma normal y del paciente en tubos de plástico en la siguiente proporción de plasma normal y plasma del paciente: 10:0, 9:1, 8:2, 5:5, 2:8, 1:9 y 0:10. Pipetear 0,2 ml de cada mezcla en un tubo de cristal a 37 °C. Añadir 0,1 ml de caolín e incubar durante 3 min, añadir entonces 0,2 ml de $CaCl_2$ y anotar el tiempo de coagulación.

Resultados

Trazar los tiempos de coagulación frente a la proporción de plasma normal y del paciente en un papel milimetrado lineal, tal y como se muestra en la figura 17.2

Interpretación

El patrón obtenido de cada paciente debe valorarse críticamente. Un patrón convexo (patrón 1) indica un resultado positivo, mientras que un patrón cóncavo (patrón 4) indica un resultado negativo. El patrón 2 indica un déficit del factor de coagulación y del ACL. El patrón 3 se encuentra en el plasma que contiene el anticoagulante, y es también deficitario en un cofactor necesario para el efecto inhibidor completo. La tasa inicial de la pendiente es importante, porque una pendiente pronunciada indica un resultado positivo. Esto permite simplificar la prueba, de modo que se llevan a cabo sólo el 100% de los normales y el 80% de los normales/20% de las pruebas con plasma normal. Se puede calcular la pendiente utilizando el cociente de TCC al 20% del plasma de la prueba y el TCC al 100% del plasma de control normal (N). Para obtener un resultado positivo, el cociente en este punto debería ser de 1,2 o mayor. Así,

$$\frac{\text{TCC (80\% N: 20\% prueba)}}{\text{TCC (100\% N)}} \geq 1{,}2$$

Un TCC de control inferior a 60 s puede indicar una contaminación del plasma control con fosfolípidos.

Tiempo del veneno de la víbora de Russell diluido

Principio

El veneno de víbora de Russell (VVR) activa el factor X, produciendo la coagulación de la fibrina en presencia de factor V, protrombina, fosfolípidos e iones calcio. El ACL prolonga el tiempo de coagulación, ya que se une a los fosfolípidos y evita la acción del VVR. Como describe la siguiente prueba, la dilución del veneno con fosfolípidos lo hace particularmente sensible para detectar ACL[7]. Ya que el VVR activa el factor X directamente, los defectos en el sistema de contacto y los déficits en los factores VIII, IX o XI no influyen en la prueba. El TVVRD[8] se combina normalmente con un proceso de neutralización de plaquetas/fosfolípido para añadir especificidad, y está incorporado en numerosos equipos comerciales.

Reactivos

Plasma pobre en plaquetas. Del paciente y del control (v. pág. 336).

Plasma normal de reserva.

Tampón glioxalina 0,05 mol/l, pH 7,4 (v. pág. 341).

VVR (American Diagnostica Inc.). Solución madre: 1 mg/ml en solución salina. Para la solución operativa diluir aproximadamente 1:20 en tampón. La solución operativa es estable a 4 °C durante varias horas.

Fosfolípidos. Sustitutos de plaquetas; también disponibles en el mercado.

$CaCl_2$. 0,025 mol/l (v. pág. 341).

Preparación de los reactivos

Hay que ajustar la concentración de VVR hasta obtener un tiempo de coagulación de 30-35 s cuando se añada 0,1 ml de VVR a la mezcla de 0,1 ml de plasma normal y 0,1 ml

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

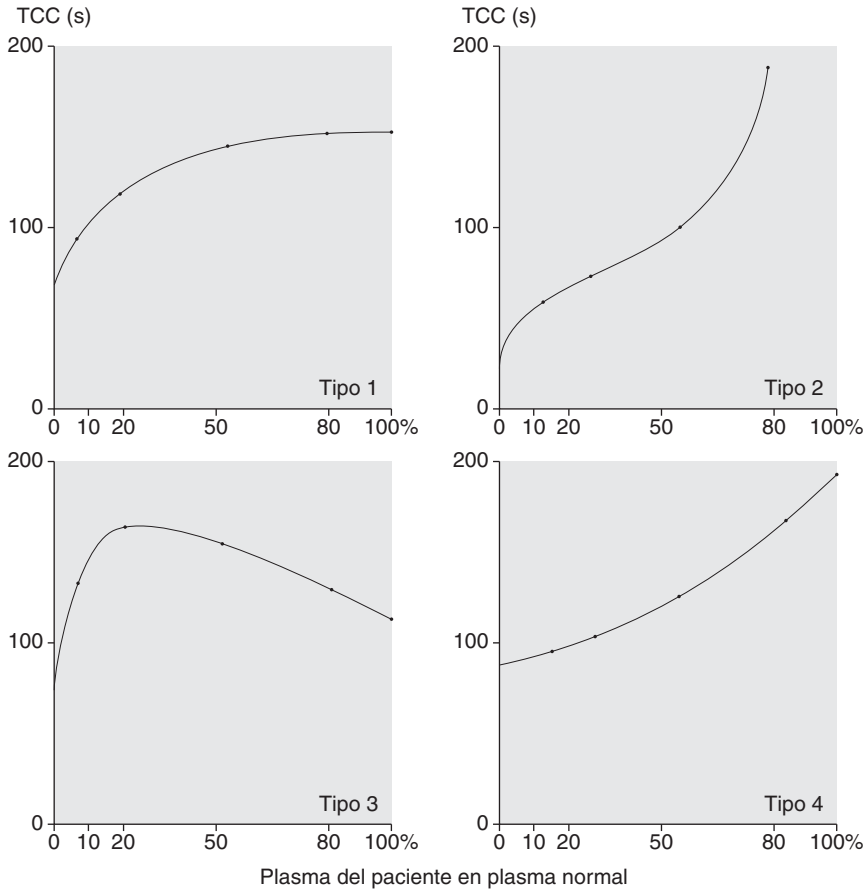


Figura 17.2. Curvas obtenidas utilizando el tiempo de coagulación del caolín (TCC) para estudiar la presencia de anticoagulante lúpico (v. texto).

de fosfolípidos no diluidos. La prueba se repite entonces utilizando diluciones dobles del reactivo con fosfolípidos. La última dilución de los fosfolípidos, antes de que el tiempo de coagulación se prolongue 2 s o más, es la que se selecciona para la prueba (dando, por tanto, un tiempo de coagulación de 35-37 s).

Método

Colocar 0,1 ml de plasma normal y 0,1 ml de reactivo fosfolípido diluido en un tubo de cristal a 37 °C. Añadir 0,1 ml de VVR diluido y, tras calentar durante 30 s, añadir 0,1 ml de $CaCl_2$. Anotar el tiempo de coagulación. Repetir la secuencia utilizando el plasma problema. Calcular la proporción de los tiempos de coagulación del plasma problema y del control (mezcla de plasmas normales).

Interpretación

La ratio normal se debe calcular en cada laboratorio; se encuentra normalmente entre 0,9 y 1,05. Ratios mayores de 1,05 sugieren la presencia de ACL, pero pueden aparecer también en la alteración de los factores II, V o X, fibrinógeno o algún otro inhibidor. La presencia de un inhibidor se puede confirmar analizando una mezcla a volúmenes iguales de plasma del paciente y plasma control, mientras que la dependencia de los fosfolípidos se puede confirmar utilizando la prueba de neutralización plaquetaria, que se describirá más adelante. La adición de plasma normal corrige un resultado alterado de la prueba del VVR diluido como resultado de un defecto o déficit de un factor, pero no hace lo mismo en presencia de ACL. El procedimiento de neutralización de las plaquetas acorta el tiempo de coagulación en aquellas pruebas del VVR diluido con plasma que contenga el ACL (v. más adelante).

Prueba de neutralización plaquetaria

Principio

Cuando se usan las plaquetas en lugar de los reactivos fosfolipídicos en las pruebas de coagulación, estas pruebas dejan de ser sensibles al ACL. Esto parece deberse a la capacidad de las plaquetas de adsorber el ACL. Para utilizar esta propiedad de las plaquetas, hay que lavarlas para eliminar las proteínas contaminantes del plasma, o activarlas o «fragmentarlas» para que se expongan sus sitios de unión a los factores coagulantes.

Reactivos

Reactivo de extracto plaquetario comercial o plaquetas normales lavadas.

Solución anticoagulante ácido-citrato-dextrosa (ACD) (v. pág. 587). Se necesita un pH de 5,4 para las plaque-

tas lavadas. Para su utilización, se añaden 6 partes de sangre a 1 parte de este anticoagulante.

Na_2EDTA 0,1 mol/l en solución salina.

Tampón Tyrode libre de calcio. Disolver 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 0,625 g de Na_2HPO_4, 0,415 g de $MgCl_2$ y 1,0 g de $NaHCO_2$ en 1 l de agua. Ajustar el pH si fuera necesario a 6,5 con HCl 1 mol/l.

Método

Extraer sangre normal en ACD y centrifugar a 270 g durante 10 min. Pipetear el sobrenadante de plasma rico en plaquetas (PRP) en un contenedor de plástico, y centrifugar de nuevo para obtener más PRP, que se añade a la primera muestra. Diluir el PRP en un volumen igual de tampón libre de calcio, y añadir 1:10 volúmenes de EDTA, para dar una concentración final de 0,01 mol/l. Centrifugar la mezcla en un tubo cónico o redondeado a 2.000 g durante 10 min, y desechar el sobrenadante. Volver a suspender con cuidado los fragmentos de plaquetas en tampón y añadir EDTA 0,01 mol/l. Centrifugar de nuevo, desechar el sobrenadante y volver a suspender los fragmentos en tampón solo. Centrifugar entonces las plaquetas una tercera vez, y volver a suspender los fragmentos en tampón sin EDTA para obtener un recuento de plaquetas de al menos 400×10^9/l. Las plaquetas lavadas se pueden almacenar a –20 °C en volúmenes de 1-2 ml. Antes de usarlo, se deben activar por descongelación y recongelación repetida 3-4 veces.

Usar plaquetas lavadas o el reactivo comercial en la prueba de VVR diluido o en el TTPA en lugar del reactivo fosfolipídico habitual. Primero, determinar una dilución apropiada analizando un rango de diluciones dobles en el sistema de prueba con el plasma control. Una dilución apropiada nos da un tiempo de coagulación similar al obtenido cuando se usa el plasma control y el reactivo fosfolípido.

Interpretación

La adición de plaquetas o de un reactivo fosfolípido «confirmado» comercial al sistema de TVVRD acorta el tiempo de coagulación cuando está presente el ACL. No acorta el tiempo cuando la prolongación se debe a un déficit de un factor o a un inhibidor dirigido contra un factor de la coagulación específico. Sin embargo, la capacidad de los diferentes lotes para llevar a cabo esta corrección es variable y puede variar mucho con el almacenamiento. Por consiguiente, cada vez que se desarrolle una prueba, se debería analizar en paralelo una muestra de plasma que se sepa que contiene ACL, para establecer la eficacia de las plaquetas.

Actualmente hay muchos equipos comerciales disponibles para llevar a cabo las pruebas descritas previamente. Como en todas estas pruebas, hay un «sacrificio» inevitable entre sensibilidad y especificidad. Esto varía con las diferentes técnicas, equipos y coagulómetros. Un estudio de reactivos encontró que el mejor discriminador de positividad se conseguía utilizando una ratio de corrección normalizada (RC) de los tiempos de coagulación de TVVRD, de la siguiente manera:

$$RC = \frac{\left(\frac{P_D}{N_D}\right) - \left(\frac{P_C}{N_C}\right)}{\frac{P_D}{N_D}}$$

donde P = el paciente; N = plasma normal; D = el proceso de detección, y C = el procedimiento de confirmación (neutralización plaquetas/fosfolípidos). Una corrección de más del 10% se considera positiva, pero se debe tener cuidado a la hora de establecer un rango de normalidad para cada laboratorio, y también se pueden utilizar otros cálculos[5].

Se pueden obtener resultados falsos positivos en pacientes que reciban heparina por vía intravenosa y la interpretación puede ser complicada en los pacientes que reciban anticoagulantes orales. Esto último se puede solventar a veces realizando pruebas sobre una mezcla 50:50 con un plasma normal.

Prueba de inhibición de la tromboplastina diluida

Principio

Cuando la tromboplastina utilizada para el TP se diluye, el TP se prolonga. Al llegar a cierto punto (normalmente a una dilución 1:50 o 1:500), la concentración de fosfolípidos es lo suficientemente baja como para que la prueba se vuelva sensible a los anticuerpos fijadores de fosfolípidos, y cuando el ACL está presente, la ratio del tiempo de coagulación del plasma problema frente al plasma normal aumenta. Esta prueba es más útil ahora porque algunos reactivos de la tromboplastina (p. ej., Innovin) son más sensibles al ACL. Sin embargo, debe remarcarse que la dilución de la tromboplastina hace que el sistema sea sensible a concentraciones bajas de factor VIII, como se encuentra en la hemofilia leve, la hemofilia adquirida y en concentraciones bajas de factor V y factor VII. Se debe tener cuidado de no confundir estas alteraciones. En un estudio[9], la prueba se consideró positiva cuando la ratio del TP diluido (prueba/normal promedio) usando Innovin a una dilución 1:200 fue mayor de 1,15.

Ratio textarina/ecarina

Principio

La ratio textarina/ecarina es una prueba sensible y relativamente específica para el ACL basada en fracciones de venenos de dos serpientes. La textarina es una fracción proteica del veneno de *Pseudonaja textilis* (serpiente oriental marrón australiana) que activa la protrombina en presencia de fosfolípidos, factor V e iones calcio[10]. La ecarina es una fracción proteica del veneno de *Echis carinatus* (víbora gariba o víbora con escamas aserradas de la India) que activa la protrombina en ausencia de cualquier cofactor. La activación de la protrombina por la textarina produce trombina, mientras que la ecarina produce meizotrombina (un intermediario de la activación de la protrombina). En presencia de un ACL, el tiempo de textarina se prolonga, mientras que el tiempo de ecarina no se ve afectado.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Resultados

Los resultados se expresan como una ratio de los tiempos de textarina/ecarina. Los resultados positivos vienen indicados por una ratio superior a 1,3.

Cuando se hacen pruebas para el ACL con muestras heparinizadas, se incorpora polibreno a la textarina. Se pueden obtener falsos positivos en presencia de un déficit de factor V e inhibidores específicos del factor V. Se ha publicado que esta prueba es útil para identificar ACL en muestras de pacientes que han recibido warfarina, porque la acción de la ecarina no se ve afectada por la falta de vitamina K[11].

Interpretación de las pruebas de anticoagulante lúpico

No hay una única prueba que detecte todos los anticoagulantes de tipo lúpico, y si se sospecha clínicamente, entonces se deben realizar dos, o si es posible, tres pruebas específicas antes de concluir que uno de ellos no está presente[4,12,13]. En cambio, una prueba positiva se debe repetir 6-8 semanas más tarde, porque puede haber un positivo transitorio, como resultado de una enfermedad o medicación intercurrente. Es crucial distinguirlos de los anticuerpos específicos anti-factor VIII, los cuales tienen típicamente más dependencia del tiempo, pero pueden tener también efectos inmediatos; puede ser de utilidad analizar los factores específicos. De la misma manera, algunos ACL débiles se neutralizan con una mezcla 50:50 con plasma normal, y algunas veces muestran un efecto dependiente del tiempo. Algunos inhibidores de la coagulación transitorios no específicos no se detectan con las pruebas para el ACL. Las pruebas son, por lo general, negativas mientras se toma warfarina.

Análisis de anticardiolipina

El efecto del ACL se produce por miembros del grupo de anticuerpos antifosfolípido. Estos anticuerpos no se unen al fosfolípido en sí mismo, sino a numerosas proteínas diferentes, cuya unión está facilitada por la presencia de fosfolípidos. Las proteínas que se unen de esta manera son la β2 glucoproteína 1, la protrombina, la anexina V y la cardiolipina. Los más frecuentes de todos son los anticuerpos anticardiolipina[14]. Estos anticuerpos se detectan utilizando la proteína pertinente en inmunoensayos en placas de microvaloración o en tubos de poliestireno recubiertos. Es posible que la prueba de la cardiolipina más prevalente en la actualidad se sustituya por pruebas de anticuerpos anti-β2 glucoproteína 1, porque éstos pueden tener una relación más estrecha con la trombosis. No obstante, esto no es estrictamente cierto y aún no se dispone de estandarización. Para estos análisis existen equipos comerciales.

Se debe tener cuidado en la selección de los sueros de control y en calibrar el punto de corte para los valores normales. También es importante recordar que se pueden encontrar anticuerpos anticardiolipina tras infecciones víricas, incluyendo la mononucleosis infecciosa, y tras un infarto de miocardio.

Hay muchas otras alteraciones que se asocian con un riesgo aumentado de trombosis, pero que no se diagnostican de manera habitual utilizando pruebas basadas en la coagulación. Su posición en el estudio de la trombosis se ilustra en la figura 17.1, y en este libro también se describen las pruebas adecuadas para algunas de ellas, como los trastornos mieloproliferativos o la hemoglobinuria paroxística nocturna. Uno de los factores precipitantes más importantes para las trombosis es la enfermedad maligna. Sin embargo, el valor de realizar muchas pruebas en busca de posibles enfermedades malignas en pacientes con trombosis sigue en discusión; algunos estudios han demostrado que la historia y el examen combinados con unas pocas pruebas como se indica en la figura 17.1 detectan virtualmente todos los casos de enfermedad maligna y otros trastornos sistémicos.

Otras pruebas de detección han sido eficaces a la hora de detectar enfermedades ocultas, pero sin mejorar los resultados[16,17].

ESTUDIO DE LOS ESTADOS TROMBÓTICOS HEREDITARIOS

Las pruebas para descartar síndromes trombóticos son cada vez más frecuentes, a pesar de las dudas acerca de su utilidad clínica[1,18,19]. Normalmente se remiten para estudio las pacientes con alteraciones en el embarazo y aquellos con alteraciones trombóticas. La detección debe empezar excluyendo las causas comunes de una tendencia trombótica adquirida, como se describe previamente. El siguiente paso es hacer una historia familiar minuciosa; sin embargo, unos antecedentes negativos no excluyen una tendencia trombótica hereditaria, porque el defecto tiene una penetrancia variable, o puede deberse a una nueva mutación. Al igual que en la tendencia al sangrado, los estudios de laboratorio son procedimientos que se realizan paso a paso, comenzando con las pruebas de primera línea, más simples (como se muestra en la fig. 17.1). Las pruebas más relevantes se describen a continuación.

Antitrombina (AT)

La AT[20,21] (antes conocida como antitrombina III) es el principal inhibidor fisiológico de la trombina y de los factores IXa, Xa y XIa. El déficit de AT se encuentra en aproximadamente un 2% de los casos de trombosis y puede ser adquirido o congénito. Se dispone de varios métodos para medir tanto la actividad funcional como la cantidad antigénica de AT. Los métodos funcionales se basan en la reacción de la trombina o del factor Xa, y pueden ser análisis de coagulación o cromogénicos. A continuación se describe un análisis cromogénico.

Medida de la antitrombina (AT) utilizando un análisis cromogénico

Principio

En presencia de heparina, la antitrombina (AT) reacciona rápidamente para inactivar la trombina, formando un

complejo 1:1. El análisis AT cromogénico es un procedimiento en dos pasos. En el primer paso, la muestra de plasma se incuba con una cantidad fija de trombina y heparina. En el segundo paso, se mide la acción de la trombina residual sobre un sustrato cromogénico sintético por espectrometría, que tiene como resultado la liberación del colorante paranitroanilina (pNA). El uso de trombina bovina evita interferencias en el análisis por el cofactor II de la heparina; esto también se puede conseguir midiendo la capacidad neutralizadora del Xa de la AT y un sustrato cromogénico apropiado. El análisis mide así la actividad del cofactor de heparina más que la actividad progresiva de la AT, y puede, por tanto, detectar también las variantes de AT cuando se une a la heparina alterada.

Método

Realizar el procedimiento en diluciones de plasma control para construir una gráfica estándar. Analizar las diluciones del plasma en estudio de manera idéntica, y leer los resultados directamente de la gráfica estándar.

Los reactivos proporcionados y los detalles del método varían entre los fabricantes y deben seguirse al pie de la letra. Puede haber también diferencias entre los distintos lotes del mismo reactivo.

Intervalo normal

El intervalo de normalidad se encuentra por lo general entre 0,75 y 1,25 UI/ml. Algunos fabricantes sugieren un intervalo ligeramente más estrecho (es decir, 0,8-1,20 UI/ml), pero es preferible que cada laboratorio establezca su propio intervalo de normalidad. Repetidas congelaciones y descongelaciones del producto, así como su almacenamiento a –20 °C o más, nos llevan a una reducción en la concentración de AT.

Interpretación

En un déficit hereditario, la concentración de AT es por lo general inferior a 0,7 UI/ml. Muchos casos son heterocigotos para mutaciones nulas y tienen concentraciones de aproximadamente el 50% del normal. Hay que tener en cuenta que se han descrito numerosas variantes, algunas de las cuales dan resultados muy próximos al valor normal en los ensayos. Es posible que se necesiten pruebas adicionales, como la del antígeno AT o la inmunoelectroforesis cruzada[22]. La baja concentración de AT puede deberse a trombosis activa, enfermedades hepáticas, terapia con heparina, síndrome nefrótico o terapia con asparaginasa; también se encuentran a veces concentraciones muy bajas en casos de coagulación intravascular diseminada (CID) o fallo hepático fulminante. Los recién nacidos normales tienen una concentración de AT menor (0,60-0,80 UI/ml) que los adultos. En los neonatos con un déficit congénito se pueden encontrar concentraciones muy bajas (0,30 UI/ml e incluso menores). Encontramos concentraciones muy altas tras un infarto de miocardio y en algunas formas de enfermedad vascular. También es importante recordar que la terapia anticoagulante oral puede aumentar la concentración de AT aproximadamente 0,1 UI/ml en casos de déficit congénito.

Determinación del antígeno de antitrombina

El antígeno AT se puede valorar utilizando diversos métodos, tales como el ELISA, los ensayos de inmunoelectroforesis y la aglutinación con látex (nefelometría).

Principio

Los ensayos de aglutinación con látex se basan en la aglutinación de una suspensión de partículas de microlátex, recubiertas de anticuerpos, en presencia de plasma que contenga antígeno AT (el anticuerpo se une por enlace covalente). La longitud de onda tiene que ser adecuada para que la luz pueda pasar a través de la suspensión de látex que no se haya absorbido. Sin embargo, en presencia del antígeno AT, las partículas de látex cubiertas con anticuerpo se aglutinan para formar agregados de un diámetro mayor a la longitud de onda de la luz y esta última se absorbe. Hay una relación directa entre el valor de la absorbancia observada y la concentración de los antígenos que se van a medir. La ventaja de esta prueba es que se puede realizar con analizadores automáticos.

ESTUDIO DEL DÉFICIT DE PROTEÍNA C (PC)

Análisis de la proteína C

La proteína C[23] es una proteína dependiente de la vitamina K. Tras la activación por la trombina, que se ve acelerada por la presencia de trombomodulina en el endotelio vascular, la PC forma complejos con los fosfolípidos y la PS para degradar los factores Va y VIIIa. Los déficits hereditarios heterocigotos de PC se detectan en un 2-4% de los primeros episodios de trombosis y en el 5-7% de todos los episodios tromboembólicos recurrentes en adultos jovenes[18,19]. La importancia del sistema PC-PS se manifiesta en el catastrófico síndrome de la *purpura fulminans* en neonatos con déficit de PC o de PS homocigota[24]. El déficit de PC adquirido se encuentra siempre asociado a un déficit o a un defecto de vitamina K, incluyendo la terapia con anticoagulantes orales. También se encuentra una baja concentración plasmática en la CID, en la enfermedad hepática y en el postoperatorio inmediato.

La PC se puede medir utilizando un análisis cromogénico, un análisis de coagulación o un método antigénico.

Medición de la proteína C funcional por el método Protac

Principio

En presencia de un activador de veneno de serpiente específico, la PC se convierte en su forma activa. Esto permite llevar a cabo la activación en el plasma completo, sin necesidad de separación de la PC. La PC activada se mide por su acción sobre uno de los sustratos sintéticos específicos (p. ej., S-2366, CBS65.25). La reacción se detiene con la adición de ácido acético al 50%, y la p-nitroalanina producida se mide en un espectrómetro a 405 nm.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Reactivos

Plasma pobre en plaquetas. Las muestras control y problema se centrifugan a 1.500-2.000 g durante 15 min. Tras la centrifugación, el plasma se puede almacenar a –40 °C o menos.

Protac. Es un activador derivado del veneno de la *Agkistrodon contortrix contortrix* (serpiente mocasín o víbora de la cabeza de cobre del sur). Se obtiene en el mercado; cada vial contiene polvo liofilizado, que se reconstituye y almacena según las indicaciones del fabricante.

Sustrato cromogénico específico. Reconstituido y almacenado según las instrucciones del fabricante.

Solución salina tamponada con barbital. Véase la página 588.

Acido acético al 50%.

Método

Construir la curva estándar según las instrucciones. Algunos fabricantes recomiendan el uso de calibradores comerciales o de plasma control comercial más que mezcla de plasmas normales.

El análisis se lleva a cabo con un método de dos pasos. En el primer paso, el plasma y el activador se incuban durante un período preciso de tiempo. En el segundo paso se añade el sustrato cromogénico específico y la reacción se detiene de nuevo con ácido acético en un momento dado. Leer la cantidad de color producida a 405 nm frente a un blanco de la siguiente manera: en primer lugar se mezclan el ácido acético, el activador y el sustrato cromogénico; después se añaden el estándar o el plasma del paciente a la mezcla y se mide la absorbancia a 405 nm. Las instrucciones del fabricante se deben seguir al pie de la letra. Representar la actividad de la PC frente a la lectura correspondiente de la absorbancia en un papel milimetrado lineal.

Intervalo normal

El intervalo normal es de 0,70-1,40 UI/ml. Es preferible que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de normalidad.

Otros estudios del déficit de proteína C

Si se sospecha un déficit hereditario de PC, se debe realizar un análisis inmunológico con un equipo basado en ELISA. El análisis amidolítico que se describe aquí no detecta la tasa de déficit de la PC tipo II, debido a mutaciones en el dominio Gla, aunque se pueden detectar mediante un ensayo basado en métodos coagulativos. Un problema de los análisis basados en la coagulación es su susceptibilidad a la interferencia con el FVL. Aunque se supone que el sustrato es específico, esto no es absolutamente cierto. La especificidad la confiere la inclusión de sustancias que inhiben otras enzimas capaces de disociar el sustrato. En ocasiones puede haber fallos, obteniéndose actividades de la PC falsamente elevadas, las cuales pueden enmascarar un déficit de la PC[25]. La actividad de la PC y del antígeno están reducidas en pacientes que toman antagonistas orales de la vitamina K, aunque a veces es posible hacer un diagnóstico provisional del déficit de la PC usando la ratio PC:VIIc[26]. También es importante excluir el déficit de vitamina K mediante el estudio de otros factores dependientes de la vitamina K, que deberían ser normales. Siempre que sea posible se deben hacer estudios familiares.

Análisis de la proteína C basado en técnicas coagulativas

Principio

Las técnicas coagulativas para determinar la PC utilizan un reactivo TTPA que incorpora un activador de la PC derivado del veneno de la serpiente mocasín o víbora de la cabeza de cobre *(Agkistrodon contortrix contortrix)*, plasma deficitario en PC y cloruro cálcico. Los reactivos de TTPA activan tanto la PC como los factores de la vía intrínseca. El tiempo de coagulación del plasma normal es largo (>100 s), mientras que el del plasma con déficit de PC es normal (30 s). El grado de prolongación del tiempo de coagulación cuando el plasma del paciente se mezcla con el plasma con déficit de PC es proporcional a la concentración de PC en el plasma del paciente.

A diferencia de los análisis de la PC cromogénicos, los análisis de coagulación de la PC son sensibles a los defectos funcionales de la PC, tales como la unión a fosfolípidos (mutaciones en el dominio Gla) y la unión al calcio. Sin embargo, son sensibles al FVL, a los ACL y a las concentraciones elevadas de factor VIII.

Antígeno de proteína C

La proteína C se puede medir utilizando un ELISA convencional. Se dispone también de equipos en el mercado.

Análisis de la proteína S (PS)

La PS es también una proteína dependiente de la vitamina K que actúa como un cofactor de la PC activada. Se parece a las serinproteasas del sistema de coagulación en que tiene un dominio Gla y cuatro dominios EGF; sin embargo, en lugar de un dominio proteasa, tiene un gran dominio terminal casi homólogo a la globulina de unión de las hormonas sexuales (GLHS). En el plasma, el 60% de la PS está unida a la proteína de unión del C4b (C4bBP) vía GLHS[27] y no posee ninguna actividad de cofactor de la PCA; el 40% restante está libre y disponible para interaccionar con la PCA. Los análisis funcionales de PS se basan en la capacidad de la PS para aumentar la prolongación del tiempo de la prueba de coagulación por PCA. Sin embargo, la PS tiene cierta actividad anticoagulante independiente de PCA, que también se puede medir en análisis de coagulación[28]. La medida del antígeno de PS total y libre es posible utilizando inmunoanálisis ligado a enzimas. La interpretación de los resultados del análisis de la PS es por lo general difícil, y las tres mediciones se van a considerar aquí conjuntamente.

Análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas de la proteína S libre y total

Principio

El PS total en plasma se detecta mediante un ELISA estándar utilizando anticuerpos policlonales[29]. El análisis se repite entonces usando plasma del que se ha eliminado la PS unida a C4bBP mediante precipitación con polietilenglicol (PEG). Esto nos da la medida de la PS libre.

Reactivos

Solución de precipitación de polietilenglicol (PEG). Disolver 100 g de PEG 8.000 en 200 ml de agua estéril. Preparar aproximadamente 50 ml de PEG operativo diluyendo la solución de trabajo a exactamente un 18,75% con agua estéril. Almacenar en partes alícuotas de 2 ml a –20 °C.

Tampón de recubrimiento (tampón salino fosfato, pH 7,2). 0,39 g de $Na_2HPO_4.2H_2O$, 2,68 g de $Na_2HPO_4.12H_2O$, 8,474 g de NaCl. Completar hasta 1 l y ajustar el pH a 7,2; guardar a 4 °C.

Tampón de lavado. Éste es el mismo que el tampón de recubrimiento, pero contiene NaCl 0,5 M y Tween 20 al 0,2% v/v. Añadir 10,37 g de NaCl a 1 l de tampón de recubrimiento y Tween 20 al 0,2% (mezclar bien). Guardar a 4 °C.

Tampón de dilución. Éste es el tampón de lavado con PEG 8.000 30 g/l. Guardar a 4 °C.

Tampón sustrato Na_2HPO_4 (tampón citrato fosfato, pH 5,0). 7,3 g de ácido cítrico, 23,87 g de $Na_2HPO_4.12H_2O$. Completar hasta 1 l con agua. Ajustar a pH 5,0.

o-fenilendiamina.

Anti-PS y peroxidasa conjugada anti-PS. (Dako Ltd.).

Ácido sulfúrico, 1 M.

Placas de microvaloración. (Greiner Labortechnick Ltd.).

Estándares y controles.

Peróxido de hidrógeno. 30% p/v.

Métodos

Diluir la inmunoglobulina PS antihumana a 1:1.000 en el tampón de recubrimiento (es decir, 20 µl en 20 ml de tampón). Añadir 0,1 ml en cada pocillo de la placa de microvaloración, cubrir con parafilm y dejarlo por la noche en una cámara húmeda a 4 °C. El día que se vaya a realizar el análisis, calentar la alícuota en una solución de trabajo de PEG a 30 °C. Pipetear con precisión 200 µl de las muestras estándar, del plasma del paciente y del plasma control en tubos Eppendorf cónicos; calentarlos durante 5 min a 37 °C. Añadir exactamente 50 µl del PEG calentado, tapar inmediatamente y mezclar dos veces con vórtice durante exactamente 5 s. Colocarlo en una mezcla de agua/hielo picado. Hacer lo mismo con todas las muestras por turno. Dejarlas durante 30 min en hielo fundente. Centrifugar durante 30 s en la centrífuga de Eppendorf. Ponerlas de nuevo en el hielo, y retirar 100 µl en un tubo marcado (con cuidado de no extraer ningún precipitado).

Preparar las diluciones de la muestra de control y la del paciente en tampón de dilución de PEG de la siguiente manera. Para la PS total, diluir 0,05 ml del plasma de referencia en 8 ml de diluyente. Usar el plasma de referencia precipitado con PEG para medir la PS libre; añadir 0,1 ml a 4 ml del tampón de dilución.

Preparar una serie de estándares de esta solución madre utilizando el mismo esquema de dilución para la PS total y libre.

A. Solución madre = 1,25 UI/ml.
B. 0,8 ml de solución madre + 0,2 ml de tampón = 1,0 UI/ml.
C. 0,6 ml de solución madre + 0,4 ml de tampón = 0,75 UI/ml.
D. 0,4 ml de solución madre + 0,6 ml de tampón = 0,5 UI/ml.
E. 0,2 ml de solución madre + 0,8 ml de tampón = 0,25 UI/ml.
F. 0,1 ml de solución madre + 0,9 ml de tampón = 0,125 UI/ml.
G. 0,05 ml de solución madre + 0,95 ml de tampón = 0,0625 UI/ml.

Se hace la prueba de las muestras de control y del paciente a dos diluciones: plasma con la PS total, 1:200 y 1:400, y los sobrenadantes de PEG libres de PS, 1:50 y 1:100. Eliminar el contenido de la placa previamente preparada y golpearla suavemente invertida sobre un grueso de papel absorbente. Lavar la placa tres veces en el tampón de lavado llenando todos los pocillos, dejarlo 2 min, agitar el contenido, eliminarlo y repetir. Añadir 100 µl de cada dilución del plasma estándar, del control y del paciente por duplicado a lo largo de la placa. Cubrir e incubar durante 3 h en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Lavar la placa como se describe previamente. Diluir 2 µl del anticuerpo marcado con peroxidasa en 24 ml del tampón de dilución. Añadir 100 µl del anticuerpo diluido etiquetado (conjugado con peroxidasa) a cada pocillo, y dejarlo en una cámara húmeda durante 2-3 h a temperatura ambiente. Lavar la placa como se ha descrito previamente. Completar la solución sustrato mediante la adición de 8 mg de *o*-fenilendiamina a 12 ml de tampón fosfato citrato. Inmediatamente antes de usarlo añadir 10 µl de peróxido de hidrógeno. Añadir 100 µl de solución de sustrato a cada pocillo. Cuando el estándar más bajo tenga un color amarillo visible, añadir 150 µl de ácido sulfúrico 1 M a cada pocillo. Leer las densidades ópticas en un lector de placas a 492 nm. Representar las densidades ópticas frente a las diluciones plasmáticas en un papel bilogarítmico y obtener los valores de los pacientes de su correspondiente curva de calibración (es decir, total frente a total y libre frente a libre).

El anticuerpo policlonal debe tener una afinidad similar por la PS libre y la unida; las altas diluciones plasmáticas y los tiempos de incubación bajos ayudan a evitar diferentes afinidades que nos llevan a error. Como alternativa, se pueden usar dos anticuerpos monoclonales (capturados y marcados) con la misma afinidad para la PS libre y la unida.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Se dispone actualmente de una nueva prueba que emplea dos anticuerpos distintos para medir la PS total y la libre[30].

Análisis inmunoturbidométrico del antígeno de la proteína S libre (Instrumentation Laboratories and Stago)

La PS libre se analiza midiendo el incremento de turbidez producido por la aglutinación de los dos reactivos de látex. El primer reactivo de látex se recubre con C4BP purificada, la cual tiene una gran afinidad por la PS libre en el plasma en presencia de iones calcio. La PS absorbida en el látex C4BP inicia la reacción de aglutinación con el segundo reactivo de látex, que está recubierto por un anticuerpo monoclonal dirigido contra la PS humana. La cantidad de aglutinación es directamente proporcional a la concentración de PS libre.

Análisis de la proteína S funcional

Principio

La PS funcional se puede valorar utilizando análisis coagulativos, activados de diferentes maneras. En un estudio comercial (American Diagnostica) se mezclan diluciones de plasma normal y problema con un plasma deficitario en PS. La activación de estas mezclas se logra gracias a un reactivo que contiene factor Xa, PC activada y fosfolípidos. Tras un tiempo de activación de 5 min, la formación del coágulo se inicia añadiendo cloruro cálcico. Bajo estas condiciones, la prolongación del tiempo de coagulación es directamente proporcional a la concentración de PS en el plasma del paciente. El uso del factor Xa como activador minimiza la potencial interferencia de las altas concentraciones de factor VIII.

Un estudio de la función de la PS se puede basar en el TP, en cuyo caso se evita de nuevo el efecto del factor VIII. Los análisis de PS basados en el TP utilizan plasma desprovisto de PS activado con Protac, proporcionando así PC activada. El TP se prolonga por la destrucción del factor Va mediada por el PCA-PS, lo que ocurre en presencia de PS de los plasmas problema y de control. El TP se mide utilizando tromboplastina bovina, y la prolongación es proporcional a la actividad de PS. Los detalles del proceso se desarrollan según las instrucciones del fabricante, y se pueden automatizar muchas pruebas.

Dado que los ensayos pueden ser objeto de interferencias por otros factores plasmáticos, se recomienda que el plasma que se va a estudiar se analice con dos diluciones diferentes para asegurar el paralelismo con la curva estándar.

Los análisis de PS funcional se diseñan para medir la actividad del cofactor PC de la PS, pero tal y como se dijo previamente, ésta no es su única actividad anticoagulante. La PS que está unida a la C4bBP está inadecuadamente γ-carboxilada o ha sido disociada por la trombina, tiene un efecto indeterminado en estos análisis y no contribuye a la actividad del cofactor vía PC.

Interpretación de los análisis de proteína S funcional y antigénica

El déficit de PS se ha clasificado en tres subtipos, según los patrones de resultados obtenidos en estudios funcionales y antigénicos:

Categoría	PS total	PS libre	PS funcional
Tipo I	Baja	Baja	Baja
Tipo II	Normal	Normal	Baja
Tipo III	Normal	Baja	Baja

Los estudios sugieren que los patrones tipo I y tipo III son el resultado del mismo defecto genético y que la diferencia puede ser el resultado de un aumento de C4bBP relacionado con la edad[31,32]. Muchos ejemplos de lo que se creía que era déficit de PS tipo II han demostrado ser posteriormente resultado de la presencia de FVL, que origina un resultado falsamente bajo en el análisis de la PS funcional.

Aunque una estimación de la actividad de la PS funcional sería ideal para el diagnóstico del déficit de PS, los análisis de la PS funcional disponibles son problemáticos. Al igual que otros análisis funcionales, son proclives a influencias externas: al FVL, a los ACL y a las concentraciones de otros factores de la coagulación. Por fortuna, los defectos de la PS tipo II son extremadamente raros; por tanto, la medición de PS libre es el método preferido para detectar el déficit de PS[33,34]. Se ha descrito un estudio con la PS libre extraída del plasma utilizando anticuerpos monoclonales, que evitan estos problemas, pero aún no es de uso general[35].

Las concentraciones bajas de PS pueden ser un fenómeno adquirido durante el embarazo y con la anticoagulación oral, el síndrome nefrótico, el uso de anticonceptivos orales, el lupus eritematoso sistémico y la enfermedad hepática. Se ha informado de concentraciones catastróficamente bajas en niños tras una infección por varicela, debido a la producción de autoanticuerpos[36]. Es importante destacar que el intervalo normal para mujeres premenopáusicas es significativamente menor que en otros grupos y se deben determinar los intervalos locales de normalidad para evitar una interpretación errónea, prestando atención a los efectos adicionales de la terapia hormonal y a la reducción artefactada de la PS, tal y como se ha descrito previamente[37,38]. Aunque la C4bBP se eleva durante la reacción de fase aguda, la cadena β de unión a la PS no aumenta y, como resultado, la PS libre no disminuye[39].

Resistencia a la proteína C activada

En 1993, Dahlback y cols.[40] describieron una tendencia hereditaria a la trombosis, caracterizada por una respuesta plasmática defectuosa a la PC activada. Esto se dio a conocer como una resistencia a la PC activada (RPCA) y se demostró posteriormente que en más del 90% de los casos era el resultado de una mutación Arg506Glu en el factor V de

Leiden (FVL). Esta mutación destruye un lugar de anclaje para la PCA, lo que enlentece enormemente la inactivación del Va por la PCA. También bloquea la conversión por la PCA del factor V en factor Vi, que actúa como cofactor de la degradación por la PCA del factor VIIIa. La RPCA aparece aproximadamente en un 20% de los pacientes con un primer episodio de trombosis venosa.

Principio[41]

Cuando la PC activada (PCA) se añade al plasma y se lleva a cabo el TTPA, hay por lo general una prolongación del tiempo de coagulación como resultado de la degradación del factor V y del factor VIII. La detección original de este fenómeno fue gracias a un TTPA modificado, pero también se puede detectar utilizando modificaciones del TP, el tiempo de RVV y el tiempo de coagulación del Xa. Todas estas pruebas varían ligeramente en su sensibilidad y especificidad para la mutación del FVL, que mejora por lo general mezclando el plasma problema con un plasma deficitario en factor V. Esto reduce el efecto de otros factores, como el factor VIII y la protrombina, que pueden alterar la estimación de la RPCA[42] y restablece la sensibilidad de la prueba en pacientes que están tomando anticoagulantes orales. Sin embargo, la prueba se mantiene sensible a la interferencia por los ACL. Hay numerosos equipos en el mercado para realizar estas pruebas.

Expresión de los resultados

La RPCA se publicó originariamente como una simple ratio de tiempos de coagulación con y sin PCA. El resultado se puede normalizar expresándolo como una ratio del mismo resultado obtenido con plasma normal, esto es:

$$\text{RPCA normalizada} = \frac{T + PCA}{T - PCA} \div \frac{N + PCA}{N - PCA}$$

El uso de ratios normalizadas mejora la precisión analítica, y puede también mejorar la exactitud. Sin embargo, es extremadamente importante que la mezcla de plasmas que se utiliza como control no contenga FVL, pues cantidades muy pequeñas (2,5%) afectan considerablemente a la respuesta a la PCA. Deben establecerse intervalos de normalidad para cada laboratorio, y se debe investigar su relación con la presencia de FVL.

Interpretación

El estudio de trombofilia de Leiden[43] estimó que el riesgo relativo de trombosis por PCA era de aproximadamente 7. Los estudios que utilizan sólo el análisis de ADN encuentran, por lo general, un riesgo relativo menor[44]. La mayoría de las estrategias de detección se han dirigido a la producción de pruebas que tengan una alta sensibilidad y especificidad para el FVL, pero es posible que no sea lo adecuado. Parece que la «RPCA adquirida» o la RPCA debida a otras causas representa un estado protrombótico incluso en ausencia de FVL[45], y también por la presencia de RPCA adquirida en estados protrombóticos, tales como el embarazo. Estas situaciones no se detectan (excepto los ACL) tras mezclarse con un plasma deficitario en factor V. Muchos laboratorios utilizan una combinación de pruebas en plasma y ADN para valorar el estado del paciente.

Elevación de protrombina, factor VIII y otros factores

Uno de los últimos hallazgos en la investigación de trombofilia de Leiden es que las concentraciones elevadas de protrombina se asocian significativamente con la trombosis[46]. Las concentraciones más elevadas se asocian a una mutación en la región 3´ no traducida del gen (G20210A). La mutación se detecta mediante una simple prueba basada en la reacción en cadena de la polimerasa (v. pág. 479). Posteriormente, se ha demostrado que otros factores, incluyendo el factor VIII, el factor IX y el factor XI, se asocian con la trombosis cuando están elevados[47-49].

Análisis del cofactor II de la heparina

Principio

El cofactor II de la heparina (HCII), presente en el plasma problema y en el estándar, se activa con dermatán sulfato y se incuba con trombina humana. La trombina no inhibida residual se mide mediante la unión a un sustrato cromogénico.

Reactivos

Los reactivos están disponibles en el mercado en forma de equipos.

Tampón, pH 8,2. Tris 0,05 mol/l, NaCl 0,15 mol/l, Na_2-EDTA 6,8 mmol/l, polibreno 2 mg/l, albúmina sérica bovina 10 g/l, pH ajustado con HCl.
Dermatán sulfato (libre de heparina).
Trombina humana.
Sustrato cromogénico para la trombina.
Acido acético 50%.
Mezcla de plasmas normales utilizada como estándar.
Plasma problema.

Método

Es importante seguir las instrucciones del fabricante que vienen con el equipo. Preparar una serie de diluciones de la mezcla de plasmas normales para hacer la curva de calibración. Preparar también una dilución para cada plasma problema. Incubar las diluciones con el dermatán sulfato a 37 °C en un tubo de plástico o en una placa de microvaloración. Añadir a continuación la trombina, seguida, tras una nueva incubación, del sustrato cromogénico. Tras el tiempo de reacción adecuado, y según las instrucciones del fabricante, añadir ácido acético para detener la reacción, y medir la absorbancia a 405 nm en un espectrómetro o en un lector de placas de microvaloración.

Cálculo

Leer la absorbancia del plasma problema en la curva de calibración y expresarla como un porcentaje normal.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Intervalo normal
El intervalo normal es por lo general de 0,55-1,45 UI/ml.

Interpretación
Las concentraciones plasmáticas del cofactor II de heparina pueden estar aumentadas en mujeres sanas que toman anticonceptivos orales, en el embarazo, o como parte de una respuesta de fase aguda. Disminuyen en el déficit congénito, en las anemias hemolíticas crónicas, en la enfermedad hepática y en la CID[50]. En algunos individuos con tromboembolismo recurrente se encuentra cierto grado de déficit. Sin embargo, no hay evidencia clara de que el déficit de HCII sea más prevalente en este grupo que en la población normal; por consiguiente, no se recomienda hacer estos estudios como parte de la investigación de la trombofilia.

SISTEMA FIBRINOLÍTICO

Estudio de la sospecha de disfibrinogenemia

Se debe sospechar disfibrinogenemia congénita asociada a trombosis en aquellos individuos con un tiempo de trombina prolongado y con una concentración de fibrinógeno en plasma ligera o moderadamente reducida. La presencia del disfibrinógeno se demuestra cuando se encuentra una discrepancia significativa (por lo general, doble) entre los análisis de Clauss y el del peso del coágulo. Para detalles sobre los análisis, véase la página 344.

Estudio del sistema fibrinolítico: consideraciones generales

La investigación de la fibrinólisis tiene un lugar incierto en la hemostasia. Parece bien establecido que una capacidad fibrinolítica incontrolada, como resultado del déficit del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) o la antiplasmina, puede llevar a una tendencia hemorrágica, aunque esto es raro[51,52]. Por el contrario, no hay una buena evidencia de que una capacidad fibrinolítica alterada dé como resultado una tendencia a la trombosis venosa. Esto se puede atribuir, en parte, a la baja reproducibilidad de los estudios globales de lisis de coágulo de euglobulina o de lisis de la placa de fibrina, pero la incertidumbre no se ha podido eliminar ni siquiera utilizando análisis específicos ni marcadores polimórficos genéticos[53]. Aunque es frecuente hallar una fibrinólisis reducida en los pacientes que han tenido una trombosis venosa, parece que esto no tiene un valor prospectivo[54]. De manera similar, parecía que concentraciones altas del activador tisular del plasminógeno (tPA) serían predictivos de un infarto de miocardio en el estudio de la ECAT (European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities), pero parece más probable que, en ambos casos, la asociación pueda interpretarse mejor demostrando una alteración en la función endotelial, más que un problema con la fibrinólisis *per se*[55-58].

La fibrinólisis muestra variaciones diurnas considerables, así como una interferencia con los lípidos plasmáticos y el estrés. Es preferible, por tanto, realizar estas pruebas en la mañana siguiente a un profundo descanso nocturno, tras un período sin fumar, y después de que el sujeto haya estado tumbado descansando durante al menos 15 min (la semivida plasmática del tPA es de aproximadamente 5 min). Se requiere mucho cuidado a la hora de obtener y manejar las muestras para los análisis que se describirán más adelante[59]. Las pruebas para los productos de degradación del fibrinógeno y la fibrina se describen en el capítulo 16.

Estudio de la sospecha de un defecto o déficit del plasminógeno

Se puede encontrar un defecto o déficit hereditario del plasminógeno en el 2-3% de los casos no explicados de trombosis en personas jóvenes[60,61]. Sin embargo, la relación entre el déficit y la trombosis aún no está clara. La detección de laboratorio se debe realizar con un análisis funcional, basado en la transformación completa del plasminógeno en plasmina mediante los activadores. Dichos análisis pueden ser caseinolíticos, con sustrato de fibrina o cromogénicos.

Análisis cromogénico del plasminógeno

Principio
En este análisis amidolítico en dos tiempos, el plasminógeno forma complejo en un primer tiempo con el exceso de estreptocinasa. En el segundo tiempo, la actividad tipo plasmina del complejo estreptocinasa-plasminógeno se mide por su efecto sobre un péptido específico para la plasmina. La cantidad de colorante liberado es proporcional a la cantidad de plasminógeno disponible en la muestra que ha formado complejo con la estreptocinasa. El complejo estreptocinasa-plasminógeno no es inhibido significativamente por los inhibidores de la plasmina plasmáticos.

Reactivos y método
Se pueden encontrar los detalles en las instrucciones del fabricante. Varían entre fabricantes e incluso dentro de los lotes de un mismo equipo.

Intervalo normal
El intervalo normal es de 0,75-1,60 UI/ml.

Interpretación
La concentración de plasminógeno está reducida en recién nacidos, en pacientes con cirrosis o con CID, y durante y después de una terapia trombolítica, pero el análisis es menos fiable en estas circunstancias porque los productos de degradación del fibrinógeno/fibrina (o las concentraciones altas de fibrinógeno) pueden aumentar la actividad de la plasmina. El plasminógeno es un reactante de fase aguda, y encontramos una concentración elevada en infecciones, traumatismos, infarto de miocardio y enfermedades malignas. El diagnóstico de déficit de plasminógeno hereditario

se debe confirmar con una prueba funcional utilizando otros activadores, ensayos inmunológicos y estudios familiares.

Estudio del «potencial fibrinolítico»

El «potencial fibrinolítico» se mide como el efecto combinado de los activadores y los inhibidores del plasminógeno. La concentración de activadores puede aumentar por oclusión venosa o por la administración de DDAVP (1-desamino-8-D-arginina vasopresina, también conocida como desmopresina). Las pruebas utilizadas son, en primer lugar, los estudios de activadores de plasminógeno, que utilizan un sustrato de fibrina (tiempo de lisis de la euglobulina, lisis de las placas de fibrina y otros muchos), un sustrato cromogénico o con técnicas de ELISA; y, en segundo lugar, análisis de inhibidores. Las pruebas más utilizadas para los inhibidores son los ensayos cromogénicos de PAI y α_2 antiplasmina (AP)[62,63]. El hallazgo de un potencial fibrinolítico aumentado o disminuido se debe continuar con el estudio de los factores fibrinolíticos específicos.

Tiempo de lisis de las euglobulinas

Principio

Cuando el plasma se diluye y se acidifica, el precipitado (euglobulina) que se forma contiene activador del plasminógeno (principalmente tPA), plasminógeno y fibrinógeno. La mayoría de los inhibidores de la plasmina se quedan en la solución. El precipitado se vuelve a disolver, el fibrinógeno se coagula con la trombina y se mide el tiempo de lisis del coágulo.

Reactivos

Ácido acético
0,001%.

Trombina bovina
10 NIH UI/ml.

Plasma pobre en plaquetas fresco del paciente y de control
Dado que el tPA es muy lábil, la sangre se debe extraer en tubos de muestra fríos, que deben ser inmediatamente colocados en hielo y procesados.

Tampón glioxalina
pH 7,4 (v. pág. 341).

Método

Colocar la sangre venosa en un tubo que contenga citrato; tras la mezcla, mantener el tubo en un baño de hielo. Centrifugar la muestra tan pronto como sea posible (nunca más tarde de 30 min tras la extracción) a 4 °C a 1.200-1.500 g. Pipetear 1,0 ml de plasma en 9 ml de ácido acético. Mezclar bien y mantener en hielo durante 15 min. Centrifugar a 4 °C durante 15 min, a 1.500 g, para sedimentar el precipitado de euglobulina blanco. Desechar el sobrenadante, dar la vuelta a los tubos y limpiar las paredes con algodón hidrófilo en un bastoncillo aplicador hasta que quede completamente seco por dentro. Añadir 0,5 ml de tampón glioxalina y disolver el precipitado. Poner por duplicado volúmenes de 0,3 ml de la fracción de euglobulina disuelta en el plasma control y del paciente en tubos de cristal y coagular con 0,1 ml de trombina. Dejar reposar a 37 °C y comprobar la lisis del coágulo a intervalos de 15 min.

Intervalo normal

El intervalo normal es de 90-240 min.

Interpretación

Uno de los problemas técnicos que puede llevar a un tiempo de lisis prolongado artefactado es el fallo en el mantenimiento de una temperatura baja a lo largo de todos los pasos de la prueba. Además, el hecho de que una cantidad variable de PAI-1 precipite en la fracción de euglobulina hace esencial analizar un control normal cada vez que se lleve a cabo el análisis. El ejercicio y un tiempo de estasis venoso prolongado acortan los tiempos de lisis. Hay también una significativa variación nocturna; el tiempo de lisis es mayor por la mañana que al mediodía o por la tarde. Una fibrinólisis prolongada (como la encontrada durante la terapia fibrinolítica) puede llevar a una depleción de plasminógeno y dar lugar a un tiempo falsamente largo. En la CID, una concentración de fibrinógeno baja en el plasma del paciente produce un coágulo pequeño, que se disuelve rápidamente y nos lleva a un tiempo de lisis falsamente corto. A la inversa, concentraciones altas de fibrinógeno llevan a un tiempo de lisis prolongado.

Se encuentran tiempos de lisis largos en el último trimestre del embarazo, en el período postoperatorio, tras el infarto de miocardio, en individuos obesos y en muchos casos de trombosis venosa recurrente. Se ven tiempos de lisis muy cortos en algunas enfermedades hematológicas malignas o diseminadas y en la cirrosis. También se ve un tiempo de lisis corto en el déficit de factor XIII.

Lisis de las placas de fibrina

Principio

La mayoría de las preparaciones de fibrinógeno disponibles en el mercado vienen contaminadas con plasminógeno. Si la solución de fibrinógeno estándar se echa en una placa de Petri y se coagula con $CaCl_2$ y trombina, se obtiene una placa de fibrina sólida. Si se coloca la fracción de euglobulina en estudio en la placa, el plasminógeno de la placa se convierte en plasmina y aparece una zona de lisis alrededor de la muestra. El área de lisis es proporcional a la concentración de activador de plasminógeno en la fracción de euglobulina[64].

Reactivos

Fibrinógeno bovino
Trombina bovina
50 NIH µ/ml.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Calcio
0,025 mol/l.

Solución salina tamponada con barbital
(V. pág. 588.)

Plasma pobre en plaquetas
Del paciente y del control, extraído como se describe para el tiempo de lisis de las euglobulinas.

Equipamiento
El equipamiento incluye placas de Petri de plástico.

Método
Para preparar la placa de fibrina, diluir el fibrinógeno en un tampón salino para obtener una concentración final de 1,5 g/l. Pipetear 10 ml de fibrinógeno diluido en una placa de Petri. Colocarlo en una bandeja con concentraciones. Añadir 0,5 ml de $CaCl_2$ y 0,2 ml de solución de trombina. Mezclar los contenidos agitando de forma circular rápidamente. La placa se coagula en 10 o 20 s; para que sirva para la prueba debe estar uniformemente coagulada. Dejar reposar la placa durante 20 min. Las placas se pueden guardar durante 3-4 días a 4 °C.

Aplicar cuidadosamente 30 µl de la fracción de euglobulina, preparada como se describió para el análisis anterior, en la superficie de la placa. No es necesario hacer un pocillo. Colocar en una incubadora a 37 °C durante 24 h. Este tiempo de preparación se puede acortar mediante la adición de plasminógeno exógeno[64].

Desarrollar todo el análisis (paciente y control) por duplicado.

Resultados
Calcular la zona de lisis midiendo dos diámetros en milímetros en ángulo recto entre ellos. Multiplicar los dos valores para obtener el área aproximada de lisis en milímetros cuadrados.

Intervalo normal
El intervalo normal es variable, pero por lo general está entre 40 y 60 mm^2.

Interpretación
El área de lisis puede ser difícil de definir debido a una lisis incompleta. Sólo se deben medir las áreas de lisis clara y completa. En este sentido, la interpretación es igual que para el tiempo de lisis del coágulo de las euglobulinas excepto cuando las concentraciones del plasminógeno y de fibrinógeno en el plasma problema no afectan a los resultados. Hay los mismos problemas que en la preparación de la fracción de las euglobulinas, lo que hace necesario un control normal.

Prueba de oclusión venosa

Principio
La oclusión venosa localizada[65] de un brazo durante un tiempo determinado se utiliza como estímulo para liberar tPA de las paredes de los vasos. La idea original era que así se obtendría una medición mejor de los defectos funcionales en la fibrinólisis que con las muestras en reposo. Se miden los tiempos de lisis preoclusión y postoclusión, utilizando las pruebas de lisis de las euglobulinas o de lisis de las placas de fibrina descritos previamente. En sujetos normales, la fibrinólisis se ve ampliamente aumentada por la oclusión. Sin embargo, dados los problemas asociados a los análisis globales de fibrinólisis, parece preferible desarrollar medidas específicas de tPA antes y después de la oclusión.

Método
Extraer sangre del brazo donde se va a realizar la prueba sin estasis, colocarla en un tubo que contenga citrato y mantenerla en un baño de hielo. Inflar el brazalete del esfigmomanómetro hasta una presión en el punto medio entre la presión diastólica y la sistólica. Mantener el brazalete inflado durante 10 min. Extraer una muestra de sangre venosa distal al brazalete justo antes de desinflarlo y colocarla en hielo. Medir la lisis en ambas muestras, como se describe previamente. Esta prueba es molesta, y muchos pacientes no son capaces de tolerar un tiempo de 10 min de oclusión. Normalmente se ven petequias tras finalizar esta prueba.

Resultados
Los tiempos de lisis postoclusión deben ser más cortos que los tiempos de preoclusión. En la mayoría de los sujetos normales se encuentra un acortamiento de al menos 30 min.

Interpretación
El fracaso en el aumento de la lisis se ve en algunos casos de trombosis venosa recurrente, en personas obesas, tras cirugía, traumatismo o enfermedad grave, y en el síndrome de Behçet[63,65]. También puede ser el resultado de un fallo en la liberación del activador, debido a que la presión que se aplicó fue insuficiente o el tiempo de oclusión demasiado corto. El grado de respuesta de las personas normales varía: las personas que tienen una «buena» respuesta incrementan su concentración de tPA tres o cuatro veces, mientras que las que presentan una respuesta «pobre» pueden mostrar constantemente un aumento de la fibrinólisis muy pequeño, incluso con tiempos de oclusión más largos. Cuando se comparan las concentraciones plasmáticas de proteínas preoclusión y postoclusión, se pueden necesitar ajustes por cambios en el hematocrito[66]. El efecto de la prueba de oclusión venosa y las concentraciones de tPA son muy variables a lo lago del tiempo[67,68].

Análisis amidolítico del activador tisular del plasminógeno (tPA)

Principio
Se han descrito varios análisis amidolíticos del tPA[69,70]. Uno de ellos depende de la activación del plasminógeno purifi-

cado a plasmina en presencia de fragmentos de fibrinógeno, que estimulan la actividad del tPA en el plasma problema. La plasmina se mide con un sustrato cromogénico específico. En un segundo método, el tPA se captura mediante anticuerpos específicos unidos a una matriz de fase sólida como una placa de microvaloración; se eliminan por lavado los diversos inhibidores plasmáticos de tPA y plasmina, se añade el plasminógeno junto con un estimulador de la actividad de tPA y se mide la plasmina producida con sustratos cromogénicos. Como alternativa, se pueden usar sustratos cromogénicos específicos para tPA, pero existen problemas de especificidad, sobre todo en los ensayos plasmáticos.

Interpretación

El tPA se secreta al plasma en su forma activa, pero forma rápidamente un complejo con su principal inhibidor, el PAI-1. La cantidad de tPA activo en el plasma es el resultado de un equilibrio, y representa sólo una pequeña fracción del tPA total (antigénico). Este proceso continúa tras la extracción de sangre, a menos que se mantenga en un anticoagulante ácido apropiado (v. más adelante).

El tPA se puede medir también mediante ELISA utilizando anticuerpos monoclonales en placas de microvaloración. Aunque esto casi es análogo a la concentración de PAI-1 y dice poco acerca de la proporción de tPA activo libre, se ha visto que tiene un efecto predictivo en pacientes con angina[57]. Las diferentes concentraciones de tPA se asocian a un gran número de enfermedades[71].

Análisis del inhibidor del activador del plasminógeno

Principio

Se añade una cantidad determinada de tPA en exceso al plasma no diluido. Parte de él forma rápidamente complejo con el inhibidor del tPA (PAI). El plasminógeno del plasma se activa entonces a plasmina por el tPA residual que no ha formado complejo. La cantidad de plasmina formada es directamente proporcional a la actividad del tPA residual, e inversamente proporcional a la actividad del PAI de la muestra. La cantidad de plasmina generada se mide utilizando un sustrato específico para la plasmina.

Los reactivos están disponibles en forma de equipos, y se deben seguir exactamente las instrucciones del fabricante. El intervalo normal aún no está muy bien definido y cada laboratorio debe establecer su propio intervalo hasta que se disponga de valores normales fiables.

Se debe estandarizar el momento de recogida de las muestras. Las muestras que se recogen temprano por la mañana (7:00) tienen mucha mayor actividad que aquellas que se recogen tarde en ese mismo día. El proceso de muestreo es extremadamente importante porque el PAI se filtra desde las plaquetas en la muestra de sangre, y el PAI-1 en el plasma se convierte rápidamente en una forma latente (inactivada). También disponemos de un análisis ELISA para medir el PAI-1 total presente.

Análisis del antígeno inhibidor del activador del plasminógeno

Principio

Los pocillos de la microplaca cubiertos con un anticuerpo monoclonal anti-PAI-1 se incuban con muestras y estándares. La PAI-1 presente en las muestras y estándares se une a la fase sólida durante esta incubación. La sustancia que no se haya unido se elimina por lavado. Se añade un anticuerpo monoclonal anti-PAI-1 marcado con una enzima (conjugado). Este conjugado se une a los complejos antígeno-anticuerpo formados en la incubación previa. Los conjugados no unidos se eliminan por lavado. Finalmente, se añade el sustrato enzimático. La acción de la enzima unida al sustrato produce un color azul, que se vuelve amarillo tras parar la reacción con ácido. Las absorbancias se leen en un lector de microplacas a 450 nm. La intensidad del color es proporcional a la concentración de PAI-1. El análisis es específico para el PAI-1 total, incluyendo tanto las formas libres como las que forman complejos.

Recogida de muestras

Las muestras de sangre se deben recoger en tubos CTAD o en Diatube H (Stago) y deben colocarse inmediatamente en hielo. Las muestras de los tubos de coagulación al vacío con CTAD (Becton-Dickinson) se pueden almacenar en hielo hasta 7 h. Si la muestra no se va a analizar inmediatamente, se debe separar y congelar tan pronto como sea posible. (El CTDA es un tampón de solución de citrato trisódico con teofilina, adenosina y dipiridamol.)

Reactivos y método

Están disponibles en un equipo basado en el ELISA (Chromogenix).

Intervalo normal

El intervalo normal es, por lo general, de 11-69 ng/ml. Sin embargo, cada laboratorio debería establecer su propio intervalo de normalidad.

Análisis amidolítico del inhibidor de la plasmina (α_2 antiplasmina)

Principio

Las diluciones plasmáticas se incuban con un exceso de plasmina, una parte de la cual es inhibida por las antiplasminas. La plasmina residual no inhibida se mide utilizando un sustrato cromogénico específico. La α_2 antiplasmina es el principal inhibidor de la plasmina circulante y forma complejos mucho más rápidamente que otros inhibidores; si los tiempos de reacción son cortos, el análisis mide realmente sólo la α_2 antiplasmina.

En el mercado se encuentran diferentes equipos, que contienen todos los reactivos necesarios. Se deben seguir las instrucciones del fabricante. La especificidad se logra manteniendo tiempos de reacción cortos. Hay que tener cuidado al hacer las alícuotas de la solución de plasmina, que tiene una alta viscosidad debido a su contenido en gli-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

cerol. También hay que tener en cuenta que la plasmina unida a la macroglobulina α_2 puede escapar a la inhibición y puede llevar a subestimar la actividad inhibitoria.

El intervalo normal habitual está entre 0,80 y 1,20 UI/ml. El déficit de α_2 antiplasmina congénita se asocia con una tendencia al sangrado grave. También encontramos concentraciones reducidas en la enfermedad hepática, en la CID y durante la terapia trombolítica. La concentración de α_2 antiplasmina aumenta con la edad y es más alta en caucásicos que en africanos.

«HIPERREACTIVIDAD» PLAQUETARIA Y ACTIVACIÓN

Las plaquetas pueden ser más reactivas de lo normal como consecuencia de una activación *in vivo* por parte de la trombina o de la acción de superficies no endoteliales, tales como las válvulas protésicas o los injertos de Dacron. Esto se puede detectar a veces por un umbral disminuido (sensibilidad aumentada) para los agentes agregantes. Debido a que existe una considerable variación en la respuesta a los agentes agregantes en individuos normales, los intentos de demostrar una hiperagregabilidad raramente tienen éxito y los resultados son, a menudo, incoherentes. También se puede demostrar la agregación espontánea de las plaquetas en la sangre[72].

Las plaquetas, que han formado parte del trombo plaquetario y se han liberado al torrente sanguíneo, pueden mostrar un descenso medible en su capacidad de agregación debido a una pérdida de su contenido granular. Los contenidos liberados se pueden medir en plasma: las proteínas de los gránulos α, la β-tromboglobulina y el factor plaquetario 4 son los constituyentes que se miden más habitualmente. En general, los problemas que presentan estas pruebas las hacen de dudosa utilidad[56]; se describen en ediciones previas de este libro.

Se han publicado numerosos polimorfismos genéticos que afectan a la reactividad de las glucoproteínas plaquetarias y de las selectinas P. Aunque pueden ser útiles en estudios poblacionales, su significado clínico para pacientes individuales aún se desconoce[73-76].

Activación plaquetaria: citometría de flujo

Los problemas asociados a las pruebas previas de activación plaquetaria se han solucionado en cierta medida gracias al análisis por citometría de flujo de las plaquetas en muestras de sangre completa.

Principio

La activación de las plaquetas se asocia con la aparición de nuevos determinantes antigénicos en la superficie plaquetaria. Algunos de ellos son moléculas presentes en los gránulos plaquetarios que salen a la superficie durante la degranulación (p. ej., CD62) y otros son nuevas conformaciones de moléculas ya existentes (p. ej., GpIIbIIIa). Éstos se pueden detectar utilizando anticuerpos conjugados con fluoresceína, y el grado de expresión se puede medir por citometría de flujo. Esto nos da una medida de la activación plaquetaria, con un grado de sensibilidad mucho mayor que el PF4 o la estimación de la β-TG. Se dispone de numerosas moléculas de superficie alternativas (tabla 17.1). Estas pruebas aún no están en la práctica de laboratorio rutinaria, pero están demostrando cada vez más ser muy útiles en la investigación[77,78].

El PFA-100 ofrece una aproximación alternativa (v. página 410), donde los tiempos de obturación cortos pueden ser indicativos de hiperreactividad plaquetaria y/o hiperreactividad de muestras del factor de Von Willebrand.

HOMOCISTEÍNA

Debido a la observación de que los pacientes con homocistinuria tienen trombosis venosas y arteriales con daño vascular acelerado, ha habido un considerable interés por los pacientes con una elevación menos marcada de la homocisteína plasmática (hiperhomocistinemia)[79]. Se ha visto

Tabla 17.1. Indicadores de la activación plaquetaria detectable por citometría de flujo

Nombre	Designación de CD	Comentario
GpIb, IX, V	CD42	Disminuye
GpIIbIIIa	CD41	Aumenta
Fosfatidilserina	–	Aumenta Detectado por la unión de anexina V
Proteína de membrana integrada lisosomal (gp53, granulofisina)	CD63	Indica degranulación lisosomal
P-selección	CD62	Indica liberación de gránulos α
Fibrinógeno	–	Aumenta el fibrinógeno unido a superficie
Activación IIbIIIa	–	Cambio conformacional en IIbIIIa producido por la activación, detectado por anticuerpo PAC-1

que tiene una marcada asociación con la trombosis arterial y venosa. Hasta hace poco, la homocisteína se medía por cromatografía líquida de alta resolución o espectroscopia de masas, pero actualmente se dispone de un análisis basado en ELISA que hace más fácil su incorporación a la práctica del laboratorio de coagulación. Para estandarizar los resultados de los estudios, la homocisteína se mide tanto en ayunas como tras una carga de metionina. Se necesita un procesamiento rápido de las muestras porque la homocisteína se escapa rápidamente de los eritrocitos.

MARCADORES DE LA ACTIVACIÓN DE LA COAGULACIÓN

Hay numerosos equipos comerciales para medir las moléculas producidas por la activación de la coagulación.

Principio

La activación de muchas proteínas activas en la coagulación está mediada por la disociación proteolítica con la liberación de pequeños péptidos: péptidos de activación. El fragmento 1 + 2 de la protrombina es el que se mide con más frecuencia, y se libera cuando la protrombina se convierte en trombina. Tiene una vida media apreciable de 45 min, lo que permite la acumulación de una cantidad medible en el plasma, y proporciona una indicación de la velocidad a la que se genera la trombina.

Una alternativa es medir la concentración de los complejos trombina-antitrombina (TAT), que proporcionan una información similar. Los complejos plasmina-antiplasmina aportan información sobre la fibrinólisis. Todo ellos se pueden medir utilizando equipos de ELISA disponibles en el mercado, pero no se usan de manera rutinaria y no son necesarios para el diagnóstico normal[80]. Otras pruebas, como la del fibrinopéptido A, necesitan un cuidado excepcional y el uso de anticoagulantes especiales para prevenir la activación *in vitro* de la muestra.

FACTOR VIIa ACTIVADO

Tal y como se expone en el capítulo 16, se cree que el factor VIIa es un iniciador fisiológico de la coagulación *in vivo*; es, por tanto, un factor trombogénico potencialmente importante. La mayor parte del factor VII circula en su forma zimógena inactiva, pero aproximadamente un 1% está activado (factor VIIa). El factor VIIa tiene una vida media inusualmente larga en el plasma de aproximadamente 2,5 h, lo que ayuda a explicar este nivel y hace posible su medición.

Principio[81]

El análisis se basa en la disponibilidad del factor tisular soluble recombinante, que funciona como un cofactor para el factor VIIa pero no favorece la conversión del factor VII a factor VIIa. El tiempo de coagulación tras la adición del factor tisular soluble depende por tanto de la cantidad de factor VIIa en la muestra en estudio. Este análisis se lleva a cabo en una dilución del plasma problema en un plasma deficitario en factor VII para mejorar la especificidad. La curva estándar se obtiene con el VIIa purificado.

Interpretación

La utilidad clínica del análisis del factor VIIa aún no está establecida; sin embargo, se han encontrado concentraciones elevadas en diversos trastornos trombóticos, como la diabetes, y se cree que puede tener utilidad como factor predictor de los eventos de isquemia cardíaca. Se encuentran concentraciones reducidas en pacientes con déficit de factor IX pero no de factor VIII.

PRUEBA GLOBAL DE COAGULACIÓN

Como respuesta al fracaso de los intentos reduccionistas para encontrar análisis que predigan la trombosis o el riesgo trombótico de una manera fiable, algunos investigadores se han dirigido en sentido opuesto y han ideado análisis globales, que valoren el potencial de coagulación total de la muestra de sangre o de plasma. Estas pruebas incluyen el potencial de trombina endógena (PTE) y la tromboelastografía (TEG). Ninguno de ellos se utiliza en el diagnóstico rutinario. Algunos fabricantes han desarrollado equipos para la valoración global de la vía PC/PS.

BIBLIOGRAFÍA

1. Haemostasis, Thrombosis Task Force BCSH 2001 Investigation and management of heritable thrombophilia. British Journal of Haematology 114:512-528.
2. Greaves M 1999 Antiphospholipid antibodies and thrombosis [see comments]. Lancet 353:1348-1353.
3. Brenner B 2004 Clinical management of thrombophilia-related placental vascular complications. Blood 103:4003-4009.
4. Brandt JT, Barna LK, Triplett DA 1995 Laboratory identification of lupus anticoagulants: results of the Second International Workshop for Identification of Lupus Anticoagulants. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulants/Antiphospholipid Antibodies of the ISTH. Thrombosis and Haemostasis 74:1597-1603.
5. British Committee for Standards in Haematology 2000 Guidelines on the investigation and management of the antiphospholipid syndrome. British Journal of Haematology 109:704-715.
6. Exner T, Rickard KA, Kronenberg H 1978 A sensitive test demonstrating lupus anticoagulant and its behavioural patterns. British Journal of Haematology 40:143-151.
7. Lawrie AS, Mackie IJ, Purdy G, et al 1999 The sensitivity and specificity of commercial reagents for the detection of lupus anticoagulant show marked differences in performance between photo-optical and mechanical coagulometers. Thrombosis and Haemostasis 81:758-762.
8. Thiagarajan P, Pengo V, Shapiro SS 1986 The use of the dilute Russell viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants. Blood 68:869-874.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

9. Arnout J, Vanrusselt M, Huybrechts E, et al 1994 Optimization of the dilute prothrombin time for the detection of the lupus anticoagulant by use of a recombinant tissue thromboplastin. British Journal of Haematology 87:94-99.
10. Hoagland LE, Triplett DA, Peng F, et al 1996 APC-resistance as measured by a Textarin time assay: comparison to the APTT-based method. Thrombosis Research 83:363-373.
11. Moore GW, Smith MP, Savidge GF 2003 The Ecarin time is an improved confirmatory test for the Taipan snake venom time in warfarinized patients with lupus anticoagulants. Blood Coagulation and Fibrinolysis 14:307-312.
12. Jennings I, Kitchen S, Woods TA, et al 1997 Potentially clinically important inaccuracies in testing for the lupus anticoagulant: an analysis of results from three surveys of the UK National External Quality Assessment Scheme (NEQAS) for Blood Coagulation. Thrombosis and Haemostasis 77: 934-937.
13. Triplett DA 1996 Antiphospholipid-protein antibodies: clinical use of laboratory test results (identification, predictive value, treatment). Haemostasis 26 (suppl 4):358-367.
14. Kandiah DA, Krilis SA 1996 Laboratory detection of antiphospholipid antibodies. Lupus 5:160-162.
15. Wright SD, Tuddenham EG 1994 Myeloproliferative and metabolic causes. Baillieres Clinical Haematology 7:591-635.
16. Lee AY 2003 Screening for occult cancer in patients with idiopathic venous thromboembolism: no. Journal of Thrombosis and Haemostasis 1:2273-2274.
17. Piccioli A, Prandoni P 2003 Screening for occult cancer in patients with idiopathic venous thromboembolism: yes. Journal of Thrombosis and Haemostasis 1:2271-2272.
18. Lane DA, Mannucci P, Bauer K, et al 1996 Inherited thrombophilia. I. Thrombosis and Haemostasis 76:651-662.
19. Lane DA, Mannucci P, Bauer K, et al 1996 Inherited thrombophilia. II. Thrombosis and Haemostasis 76:824-834.
20. Tollefsen DM 1990 Laboratory diagnosis of antithrombin and heparin cofactor II deficiency. Seminars in Thrombosis and Hemostasis 16:162-168.
21. van Boven HH, Lane DA 1997 Antithrombin and its inherited deficiency states. Seminars in Hematology 34:188-204.
22. Lane DA, Olds RJ, Conard J, et al 1992 Pleiotropic effects of antithrombin strand 1C substitution mutations. Journal of Clinical Investigation 90:2422-2433.
23. Bertina RM 1990 Specificity of protein C and protein S assays. Ricerca in Clinica E in Laboratorio 20:127-138.
24. Marlar RA, Neumann A 1990 Neonatal purpura fulminans due to homozygous protein C or protein S deficiencies. Seminars in Thrombosis and Hemostasis 16:299-309.
25. Mackie IJ, Gallimore M, Machin SJ 1992 Contact factor proteases and the complexes formed with alpha 2-macroglobulin can interfere in protein C assays by cleaving amidolytic substrates. Blood Coagulation and Fibrinolysis 3:589-595.
26. Jones DW, Mackie IJ, Winter M, et al 1991 Detection of protein C deficiency during oral anticoagulant therapy use of the protein C:factor VII ratio. Blood Coagulation and Fibrinolysis 2:407-411.
27. Van Wijnen M, Stam JG, Chang GT, et al 1998 Characterization of mini-protein S, a recombinant variant of protein S that lacks the sex hormone binding globulin-like domain. Biochemical Journal 330:389-396.
28. van Wijnen M, van't Veer C, Meijers JC, et al 1998 A plasma coagulation assay for an activated protein C-independent anticoagulant activity of protein S. Thrombosis and Haemostasis 80:930-935.
29. Comp PC, Doray D, Patton D, et al 1986 An abnormal plasma distribution of protein S occurs in functional protein S deficiency. Blood 67:504-508.
30. Aillaud MF, Pouymayou K, Brunet D, et al 1996 New direct assay of free protein S antigen applied to diagnosis of protein S deficiency. Thrombosis and Haemostasis 75:283-285.
31. Simmonds RE, Zoller BH, Ireland H, et al 1997 Genetic and phenotypic analysis of a large (122 member) protein S deficient kindred provides an explanation for the co-existence of type I and type III plasma phenotypes. Blood 89: 4364-4370.
32. Zoller B, Garcia dFP, Dahlback B 1995 Evaluation of the relationship between protein S and C4b-binding protein isoforms in hereditary protein S deficiency demonstrating type I and type III deficiencies to be phenotypic variants of the same genetic disease. Blood 85:3524-3531.
33. Persson KE, Dahlback B, Hillarp A 2003 Diagnosing protein S deficiency: analytical considerations. Clinical Laboratory 49:103-110.
34. Lawrie AS, Lloyd ME, Mohamed F, et al 1995 Assay of protein S in systemic lupus erythematosus. Blood Coagulation and Fibrinolysis 6:322-324.
35. D'Angelo A, Vigano D'Angelo S, Esmon CT, et al 1988 Acquired deficiencies of protein S: protein S activity during oral anticoagulation, in liver disease, and in disseminated intravascular coagulation. Journal of Clinical Investigation 81:1445-1454.
36. Levin M, Eley BS, Louis J, et al 1995 Postinfectious purpura fulminans caused by an autoantibody directed against protein S. Journal of Pediatrics 127:355-363.
37. Gari M, Falkon L, Urrutia T, et al 1994 The influence of low protein S plasma levels in young women, on the definition of normal range. Thrombosis Research 73:149-152.
38. Faioni EM, Valsecchi C, Palla A, et al 1997 Free protein S deficiency is a risk factor for venous thrombosis. Thrombosis and Haemostasis 78:1343-1346.
39. Garcia de Frutos P, Alim RI, Hardig Y, et al 1994 Differential regulation of alpha and beta chains of C4b-binding protein during acute-phase response resulting in stable plasma levels of free anticoagulant protein S. Blood 84:815-822.
40. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ 1993 Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. Proceedings of the National Academy of Science U.S.A. 90:1004-1008.
41. Bertina RM 1997 Laboratory diagnosis of resistance to activated protein C (APC-resistance). Thrombosis and Haemostasis 78:478-482.
42. Laffan MA, Manning R 1996 The influence of factor VIII on measurement of activated protein C resistance. Blood Coagulation & Fibrinolysis 7:761-765.
43. Koster T, Rosendaal FR, de RH, et al 1993 Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study [see comments]. Lancet 342:1503-1506.
44. Ridker PM, Glynn RJ, Miletich JP, et al 1997 Age-specific incidence rates of venous thromboembolism among heterozygous carriers of factor V Leiden mutation. Annals of Internal Medicine 126:528-531.
45. de Visser MCH, Rosendaal FR, Bertina RM 1999 A reduced sensitivity for activated protein C in the absence of factor V

Leiden increases the risk of venous thrombosis. Blood 93: 1271-1276.
46. Poort S, Rosendaal F, Reitsma P, et al 1996 A common genetic variation in the 3′ untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. Blood 88:3698-3703.
47. Koster T, Blann A, Briet E, et al 1995 Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep vein thrombosis. Lancet 345:152-155.
48. Meijers JC, Tekelenburg WL, Bouma BN, et al 2000 High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. New England Journal of Medicine 342:696-701.
49. O'Donnell J, Tuddenham EG, Manning R, et al 1997 High prevalence of elevated factor VIII levels in patients referred for thrombophilia screening: role of increased synthesis and relationship to the acute phase reaction. Thrombosis and Haemostasis 77:825-828.
50. Tollefsen DM 2002 Heparin cofactor II deficiency. Archives of Pathology and Laboratory Medicine 126:1394-1400.
51. Lind B, Thorsen S 1999 A novel missense mutation in the human plasmin inhibitor (alpha2-antiplasmin) gene associated with a bleeding tendency. British Journal of Haematology 107:317-322.
52. Fay WP, Parker AC, Condrey LR, et al 1997 Human plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) deficiency: characterization of a large kindred with a null mutation in the PAI-1 gene. Blood 90:204-208.
53. Lane D, Grant P 2000 Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. Blood 95:1517-1532.
54. Crowther MA, Roberts J, Roberts R, et al 2001 Fibrinolytic variables in patients with recurrent venous thrombosis: a prospective cohort study. Thrombosis and Haemostasis 85: 390-394.
55. Thompson SG, Kienast J, Pyke SD, et al 1995 Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. New England Journal of Medicine 332:635-641.
56. Pyke SD, Thompson SG, Buchwalsky R, et al 1993 Variability over time of haemostatic and other cardiovascular risk factors in patients suffering from angina pectoris. ECAT Angina Pectoris Study Group. Thrombosis and Haemostasis 70:743-746.
57. Juhan VI, Pyke SD, Alessi MC, et al 1996 Fibrinolytic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. ECAT Study Group. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities. Circulation 94:2057-2063.
58. Ridker PM, Vaughan DE, Stampfer MJ, et al 1993 Endogenous tissue-type plasminogen activator and risk of myocardial infarction. Lancet 341:1165-1168.
59. Kluft C, Meijer P 1996 Update 1996: Blood collection and handling procedures for assessment of plasminogen activators and inhibitors (Leiden fibrinolysis workshop). Fibrinolysis 10:171-179.
60. Dolan G, Greaves M, Cooper P, et al 1988 Thrombovascular disease and familial plasminogen deficiency: a report of three kindreds. British Journal of Haematology 70:417-421.
61. Heijboer H, Brandjes DP, Buller HR, et al 1990 Deficiencies of coagulation-inhibiting and fibrinolytic proteins in outpatients with deep-vein thrombosis [see comments]. New England Journal of Medicine 323:1512-1516.
62. Wiman B, Chmielewska J 1985 A novel fast inhibitor to tissue plasminogen activator in plasma, which may be of great pathophysiological significance. Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation Suppl 177:43-47.
63. Nilsson IM, Ljungner H, Tengborn L 1985 Two different mechanisms in patients with venous thrombosis and defective fibrinolysis: low concentration of plasminogen activator or increased concentration of plasminogen activator inhibitor. British Medical Journal Clinical Research and Education 290:1453-1456.
64. Marsh NA, Gaffney PJ 1977 The rapid fibrin plate: a method for plasminogen activator assay. Thrombosis and Haemostasis 38:545-551.
65. Juhan VI, Valadier J, Alessi MC, et al 1987 Deficient t-PA release and elevated PA inhibitor levels in patients with spontaneous or recurrent deep venous thrombosis. Thrombosis and Haemostasis 57:67-72.
66. Wieczorek I, Ludlam CA, MacGregor I 1993 Venous occlusion does not release von Willebrand factor, factor VIII or PAI-1 from endothelial cells: the importance of consensus on the use of correction factors for haemoconcentration [letter] [see comments]. Thrombosis and Haemostasis 69:91, 93.
67. Marckmann P, Sandstrom B, Jespersen J 1992 The variability of and associations between measures of blood coagulation, fibrinolysis and blood lipids. Atherosclerosis 96:235-244.
68. Stegnar M, Mavri A 1995 Reproducibility of fibrinolytic response to venous occlusion in healthy subjects. Thrombosis and Haemostasis 73:453-457.
69. Mahmoud M, Gaffney PJ 1985 Bioimmunoassay (BIA) of tissue plasminogen activator (t-PA) and its specific inhibitor (t-PA/INH). Thrombosis and Haemostasis 53:356-359.
70. Holvoet P, Cleemput H, Collen D 1985 Assay of human tissue-type plasminogen activator (t-PA) with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on three murine monoclonal antibodies to t-PA. Thrombosis and Haemostasis 54:684-687.
71. Collen D 1999 The plasminogen (fibrinolytic) system. Thrombosis and Haemostasis 82:259-270.
72. Wu KK, Hoak JC 1976 Spontaneous platelet aggregation in arterial insufficiency: mechanisms and implications. Thrombosis and Haemostasis 35:702-711.
73. Lozano ML, Gonzalez-Conejero R, Corral J, et al 2001 Polymorphisms of P-selectin glycoprotein ligand-1 are associated with neutrophil-platelet adhesion and with ischaemic cerebrovascular disease. British Journal of Haematology 115:969-976.
74. Theodoropoulos I, Christopoulos C, Metcalfe P, et al 2001 The effect of human platelet alloantigen polymorphisms on the in vitro responsiveness to adrenaline and collagen. British Journal of Haematology 114:387-393.
75. Bennett JS, Catella-Lawson F, Rut AR, et al 2001 Effect of the Pl(A2) alloantigen on the function of beta(3)-integrins in platelets. Blood 97:3093-3099.
76. Afshar-Kharghan V, Li CQ, Khoshnevis-Asl M, et al 1999 Kozak sequence polymorphism of the glycoprotein (GP) Ib alpha gene is a major determinant of the plasma membrane levels of the platelet GP Ib-IX-V complex [see comment]. Blood 94:186-191.
77. Abrams CS, Ellison N, Budzynski AZ, et al1990 Direct de-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

tection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans. Blood 75:128-138.
78. Michelson AD 1996 Flow cytometry: a clinical test of platelet function. Blood 87:4925-4936.
79. D'Angelo A, Selhub J 1997 Homocysteine and thrombotic disease. Blood 90:1-11.
80. Bauer KA, Rosenberg RD 1994 Activation markers of coagulation. Baillieres Clinical Haematology 7:523-540.
81. Morrissey JH, Macik BG, Neuenschwander PF, et al 1993 Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. Blood 81:734-744.

18 Control de laboratorio de la terapia anticoagulante, trombolítica y antiplaquetaria

Mike Laffan y Richard Manning

Tratamiento anticoagulante oral 399
Estandarización del control del tratamiento con anticoagulantes orales 400
Calibración de las tromboplastinas 400
Calibración local de tromboplastinas 402
Determinación de la Ratio Normalizada Internacional 402
Intervalo terapéutico y elección de la tromboplastina 402
Manejo de la sobreanticoagulación 402
Tratamiento con heparina 403
Selección de los pacientes 404
Control de laboratorio del tratamiento con heparina 404
Tiempo de tromboplastina parcial activado para la monitorización de la heparina 405
Monitorización de la heparina a la cabecera del paciente 405
Análisis anti-Xa para la heparina 406
Prueba de neutralización con protamina 407
Trombocitopenia inducida por heparina 407
Hirudina 409
Terapia trombolítica 409
Control de laboratorio de la terapia trombolítica 409
Estudio del paciente que sangra mientras toma agentes trombolíticos o inmediatamente después 410
Terapia antiplaquetaria 410

La terapia anticoagulante y antitrombótica se administra a diversas dosis para prevenir la formación o propagación del trombo. Los fármacos anticoagulantes, a excepción de aquellos que actúan vía fibrinólisis, tienen un efecto pequeño, por no decir nulo, sobre los trombos ya formados. Hay cinco tipos principales de fármacos que requieren una consideración especial:

1. Anticoagulantes orales, cumarínicos e indanedionas, que actúan interfiriendo el paso de la γ-carboxilación en la síntesis de los factores dependientes de la vitamina K (v. pág. 329).
2. Heparina y heparinoides (de bajo peso molecular y compuestos sintéticos), los cuales tienen una acción compleja sobre la hemostasia, siendo su principal efecto la potenciación y la aceleración del efecto antitrombínico sobre la trombina y el factor Xa.
3. Agentes fibrinolíticos tales como el Ancrod (Arvin) y la reptilasa, que inducen hipocoagulabilidad por el descenso de la concentración de fibrinógeno en la sangre.
4. Inhibidores directos de la trombina, como la hirudina (natural o recombinada), que es un inhibidor altamente específico de la trombina y, por tanto, un potente anticoagulante. En el momento actual, se están llevando a cabo ensayos clínicos con nuevos inhibidores de la trombina activos por vía oral.
5. Fármacos antiplaquetarios como la aspirina, los antiinflamatorios no esteroideos, el dipiridamol y el clopidogrel, e inhibidores de la función de IIb/IIIa, algunos de los cuales son anticuerpos.

TRATAMIENTO ANTICOAGULANTE ORAL

No es posible producir una reducción terapéutica en la tendencia trombótica sin incrementar el riesgo de hemorragia. El propósito del control de laboratorio es mantener un nivel de hipocoagulabilidad que minimice de manera efectiva el riesgo combinado de hemorragia y trombosis: el rango terapéutico. Las respuestas individuales al tratamiento anticoagulante oral[1] son extremadamente variables y por eso deben ser controladas de manera regular y frecuente mediante pruebas de laboratorio, para asegurar que el efecto anticoagulante permanece dentro del intervalo terapéutico.

Selección de pacientes

Antes de comenzar con el tratamiento anticoagulante no se suelen practicar análisis generales de la hemostasia, pero

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

es aconsejable llevar a cabo un estudio de coagulación básica que incluya: tiempo de protrombina (TP), tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA), tiempo de trombina (TT) y número de plaquetas. Cualquier alteración en alguna de estas pruebas se debe investigar, pues puede revelar alguna contraindicación al uso de anticoagulantes; dichas pruebas se pueden utilizar además para controlar el efecto anticoagulante. Hay que valorar también la historia y la exploración clínica, para asegurar que no exista una diátesis hemorrágica local o general.

Métodos utilizados para el control de laboratorio del tratamiento con anticoagulantes orales

El TP de Quick en un tiempo es la prueba más común. Al principio, la falta de estandarización de las preparaciones de tromboplastina y de los métodos para expresar los resultados del TP llevó a grandes discrepancias en los resultados publicados, así como en las dosis de anticoagulación. El uso del ISI, el Índice de Sensibilidad Internacional, para asegurar la sensibilidad de una tromboplastina determinada, y el uso de la INR, la Ratio Normalizada Internacional, para informar de los resultados, han minimizado estas dificultades y han mejorado sobremanera la uniformidad en la anticoagulación y la interpretación en todo el mundo.

Se han usado sustratos cromogénicos para el control en el tratamiento anticoagulante en estudios sobre los factores X, VII o II. Aunque es posible usar la medición de un factor único, hay que recordar que el TP en un tiempo mide el efecto de los tres factores dependientes de la vitamina K (factores VII, X y II), y también se ve afectado por la presencia de PIVKA (proteínas inducidas por la ausencia o antagonismo de la vitamina K) o las formas acarboxiladas de los factores dependientes de la vitamina K. Todo esto hace posible una mejor valoración de la situación *in vivo*. Los estudios con sustratos cromogénicos son útiles cuando la presencia de un inhibidor invalida el TP y los estudios basados en la coagulación.

El Trombotest de Owren y el método de protrombina y proconvertina (P & P) de Owren y Aas se usaron en el pasado, pero actualmente no se recomiendan como control de la anticoagulación oral.

Estandarización del tratamiento con anticoagulantes orales

La estandarización de la terapia anticoagulante oral comprende los siguientes pasos:

1. Elección de una tromboplastina y determinación de su ISI por comparación con una tromboplastina de referencia.
2. Determinación para esa tromboplastina del logaritmo de la media del TP normal.
3. Realización de los TP sobre las muestras de los pacientes y conversión de los resultados a una INR.

Las tromboplastinas de referencia (de conejo y bovina) disponibles son las preparaciones de referencia de la OMS (Organización Mundial de la Salud) o materiales de referencia certificados por el European Union Bureau of Reference (BCR) (v. pág. 592). Todas las preparaciones de referencia se han calibrado según una referencia primaria de la OMS de tromboplastina cerebral humana, que se estableció en 1967.

Los siguientes términos se usan en el procedimiento de calibración que se expone a continuación:

Índice de Sensibilidad Internacional (ISI)[2]. Es la pendiente de la línea de calibración que se obtiene al trazar en el eje vertical los TP obtenidos con la preparación de referencia en el papel bilogarítmico, y en el eje horizontal, los TP obtenidos mediante la prueba de tromboplastina. Se usan las mismas muestras de plasma de pacientes en situación normal y anticoagulados para ambas series de resultados.

Ratio Normalizada Internacional (INR). Es la ratio del TP que, mediante diversos cálculos, se hubiera obtenido si se hubiera usado la tromboplastina humana de referencia primaria original para conseguir el TP.

Calibración de las tromboplastinas

Principio

La prueba de tromboplastina se debe calibrar con una tromboplastina de referencia de la misma especie (conejo frente a conejo, bovina frente a bovina)[3]. Todas las preparaciones de referencia se calibran según el material primario de origen humano y tienen un ISI, que se asigna después de un ensayo en colaboración con numerosos laboratorios de diferentes países.

Reactivos

Plasma citrado normal

Procedente de 20 donantes sanos.

Plasma anticoagulado

Procedente de 60 pacientes estabilizados con tratamiento anticoagulante oral durante al menos 6 semanas.

Para realizar esta prueba, no es necesario hacerla completa al mismo tiempo, pero se debe llevar a cabo con muestras frescas recogidas en días sucesivos.

Tromboplastinas de referencia y en estudio

$CaCl_2$

0,025 mol/l.

Método

El desarrollo de la prueba del TP se describe en la página 342. Se debe dejar que el plasma y la tromboplastina se atemperen a 37 °C durante al menos 2 min antes de mezclarlos o añadirles $CaCl_2$. Analizar cada plasma por duplicado con cada una de las dos tromboplastinas según el orden del cuadro de la página siguiente, con un retraso mínimo entre las pruebas.

Anotar el tiempo medio para cada plasma. Si hay una discrepancia superior al 10% en los tiempos de coagulación entre duplicados, repetir la prueba en ese plasma.

	Tromboplastina de referencia	Tromboplastina que se va a analizar
Plasma 1	Prueba 1	Prueba 2
	Prueba 4	Prueba 3
Plasma 2	Prueba 5	Prueba 6
	Prueba 8	Prueba 7, etc.

Calibración

Trazar los TP en un papel bilogarítmico, con los resultados obtenidos usando la preparación de referencia (y) en el eje vertical y los resultados con la prueba de la tromboplastina (x) en el eje horizontal (fig. 18.1). En un papel aritmético es preciso trazar los logaritmos de los TP (fig. 18.2). La relación entre las dos tromboplastinas viene determinada por la pendiente de la línea (b).

Se puede obtener una estimación de la pendiente, tal y como se muestra en las figuras 18.1 y 18.2; que se puede utilizar para obtener una aproximación al ISI de la prueba de la tromboplastina.

No obstante, siempre que sea posible obtener una medida fidedigna, se deben usar en su lugar los siguientes cálculos de mayor complejidad.

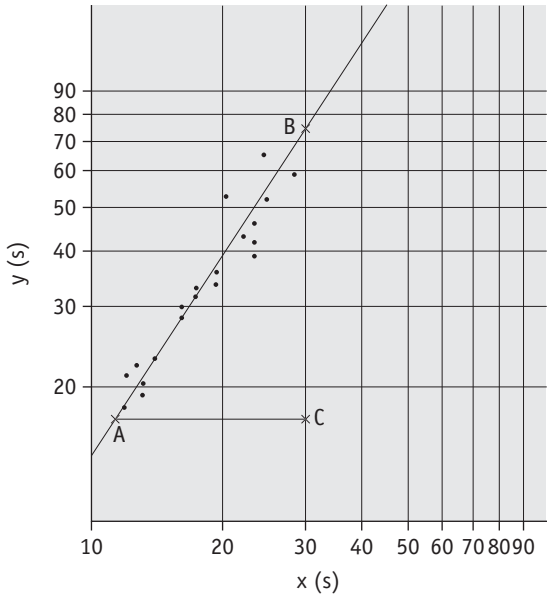


Figura 18.1. Calibración de la tromboplastina. Los TP (en segundos) con la tromboplastina en estudio se trazan en el eje horizontal (x), y con los de la tromboplastina de referencia en el eje vertical (y) en un papel bilogarítmico. Se traza a ojo la línea que mejor se ajuste y la pendiente se obtiene de la siguiente manera: Los puntos (A) y (B) se marcan en la línea justo debajo del TP más bajo registrado y justo encima del valor de TP más largo registrado, respectivamente, y (C) es la intersección de una vertical que pase por (B). La distancia entre (B) y (C) se mide con precisión en mm. La pendiente

$b = \frac{(B \text{ a } C)}{(A \text{ a } C)}$. En este ejemplo B a C = 55 mm,

A a C = 35 mm, b = 55/35 = 1,57. El ISI de la tromboplastina de referencia era de 1,11. Por lo tanto, el ISI de la tromboplastina de esta prueba = 1,11 × 1,57 = 1,74.

Cálculo del índice de sensibilidad internacional

El logaritmo neperiano de los TP obtenidos usando la tromboplastina de referencia y las pruebas de tromboplastina se denominan y_i y x_i, respectivamente, donde i = 1, 2, 3... N para cada N par de resultados.

Se hacen entonces las siguientes designaciones:

x_0 e y_0 son las medias aritméticas de los N valores de x_i e y_i, respectivamente.

Q_1 y Q_2 son la suma de los cuadrados de $(x_i - x_0)$ e $(y_i - y_0)$, respectivamente.

P es la suma de sus productos $\Sigma(x_i - x_0)\ (y_i - y_0)$

$$E = (Q_2 - Q_1)^2 + 4P^2$$

$$\text{y } b = \frac{(Q_2 - Q_1 + E^{1/2})}{2P}$$

donde b es la pendiente de la gráfica. El ISI de la preparación en estudio (ISI_t) viene dado entonces por la siguiente fórmula:

$$ISI_t = ISI_{IRP} \times b$$

donde IRP significa Preparación de Referencia Internacional.

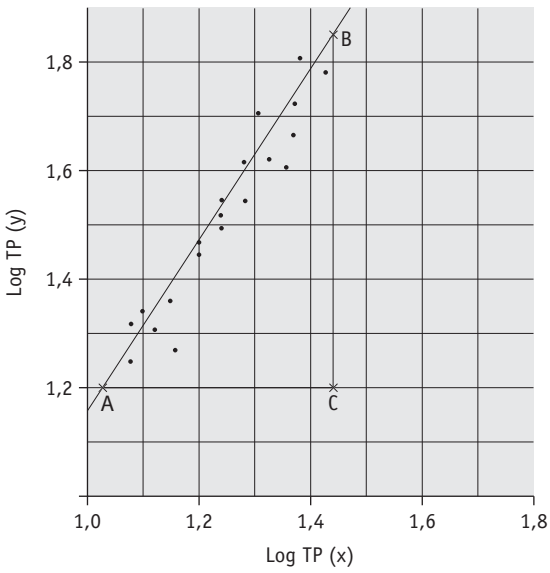


Figura 18.2. Calibración de la tromboplastina. Los TP (en segundos) se convierten en sus logaritmos y se transportan a un papel milimetrado aritmético. La pendiente se calcula como en la figura 18.1. En este ejemplo, A a C = 42 mm, B a C = 65 mm, b = 65/42 = 1,54. Por tanto, ISI = 1,11 × 1,54 = 1,71.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Calibración local de tromboplastinas

Aunque el sistema ISI ha sido muy efectivo en la estandarización del control de la anticoagulación y para mejorar la concordancia entre laboratorios, no es perfecto. Una razón de ello es que el ISI de una tromboplastina puede variar según el coagulómetro utilizado e incluso con diferentes modelos dentro del mismo instrumento. Para solventar este problema, se sugirió un sistema de calibración local. En este sistema se prueban una serie de plasmas con una INR asignada en la combinación de equipo-tromboplastina local. Estos resultados se usan para generar una curva estándar en la que las INR de futuros plasmas se puedan leer por interpolación. De hecho, el ISI del sistema se determina de forma inversa[3,4].

Tiempo de protrombina normal promedio

Hay que determinar la media del TP normal para cada serie de tromboplastinas analizando 20 muestras normales o de sangre de donantes. Se debería tener también el mismo número de hombres que de mujeres.

Revisión de la calibración

Diversos estudios externos de garantía de calidad (p. ej., UKNEQAS, v. pág. 569) reflejaron diferencias debidas a combinaciones del equipo-tromboplastina, pero no diferencias en las técnicas de muestreo de sangre (p. ej., muestras de sangre venosa y capilar). Esto puede representar un problema al utilizar muestras de sangre capilar en un centro ambulatorio, mientras que para la monitorización de la anticoagulación de los pacientes ingresados, se utilizan muestras venosas. Las revisiones regulares comparando los resultados de una serie de pacientes, cuya sangre haya sido obtenida tanto con técnicas capilares como venosas, nos proporcionarán la información que no ofrecen los estudios NEQAS[4,5].

Determinación de la Ratio Normalizada Internacional

Es esencial usar una tromboplastina cuyo ISI haya sido determinado bien por el proveedor comercial o bien (preferiblemente) de acuerdo con procedimientos locales, regionales o nacionales. El TP resultante se puede expresar entonces como INR. Usando el sistema INR/ISI, el INR del paciente debería ser el mismo en cualquier laboratorio del mundo. Para garantizar la seguridad y la uniformidad de la anticoagulación, los resultados deben referirse como INR, tanto solos como en paralelo al método localmente aceptado de informe.

La INR es la ratio del tiempo de protrombina utilizando la tromboplastina que se va a analizar, elevada a la potencia del ISI del reactivo de la prueba. La ratio del TP se calcula usando los resultados de la prueba del paciente y la media logarítmica del tiempo de protrombina normal (LMTPN) de 20 donantes normales:

$$INR = (TP\ paciente/LMTPN)^{ISI}$$

Por ejemplo, una ratio de 2,5 usando una tromboplastina con un ISI de 1,4 se puede calcular con una fórmula en la que $2{,}5^{1{,}4} = 3{,}61$, que puede ser leída tanto de una tabla logarítmica como calculada con una calculadora electrónica.

La LMTPN es la media logarítmica del TP normal (es decir, $e^{(\Sigma lnPT)/N)}$). De esta manera, se puede comparar el nivel de anticoagulación en todas las muestras de plasma y se puede establecer un rango terapéutico significativo con independencia de la tromboplastina utilizada.

Reactivo capilar

Hay una serie de reactivos comerciales disponibles para monitorizar la INR cuando se usan muestras de sangre capilar. Éstos son, por lo general, una mezcla de tromboplastina, calcio y plasma adsorbido, por lo que cuando se añade la sangre total, el reactivo mide la actividad anticoagulante global; es sensible al déficit de los factores II, VII y X. Los reactivos tienen un ISI asignado de la misma manera que las tromboplastinas individuales, y la INR se calcula a partir de la ratio de TP. Estos reactivos se suelen usar en los centros de control de la anticoagulación cuando se necesita llevar a cabo rápidamente un gran número de determinaciones de INR y de pruebas en el punto de asistencia.

Intervalo terapéutico y elección de la tromboplastina

Varias autoridades han publicado recomendaciones de intervalos terapéuticos, indicando el grado apropiado de anticoagulación en diferentes circunstancias clínicas[1,6,7]. Se basan parcialmente en ensayos clínicos controlados, pero, en cierta medida, también representan un consenso en la práctica que ha surgido en los últimos años.

La elección de la tromboplastina determina enormemente la precisión con la que se va a poder mantener el control de la anticoagulación. Si el ISI de la tromboplastina es alto, entonces un pequeño cambio en el TP representa un gran cambio en el grado de anticoagulación. Esto afecta a la precisión del análisis, y el coeficiente de variación para la prueba aumenta con el ISI. Además, el intervalo de la ratio de la protrombina se vuelve muy pequeño para cualquier intervalo dado de INR. Esto se ilustra en la figura 18.3 y en la tabla 18.1. Por estas razones, se recomienda mucho usar una tromboplastina con un ISI bajo (es decir, cercano a 1).

Manejo de la sobreanticoagulación

La estrategia del tratamiento de pacientes cuya INR excede el rango terapéutico con o sin sangrado se muestra en la tabla 18.2[6].

Estudios en el punto de atención

Ahora disponemos de planes y protocolos de monitorización de la INR en el punto de atención fuera del hospital. Requieren una selección y una estandarización de los analizadores apropiados y un programa de control de calidad que incluya la participación en un esquema de evaluación externa de la calidad. Es esencial tener un enlace con el la-

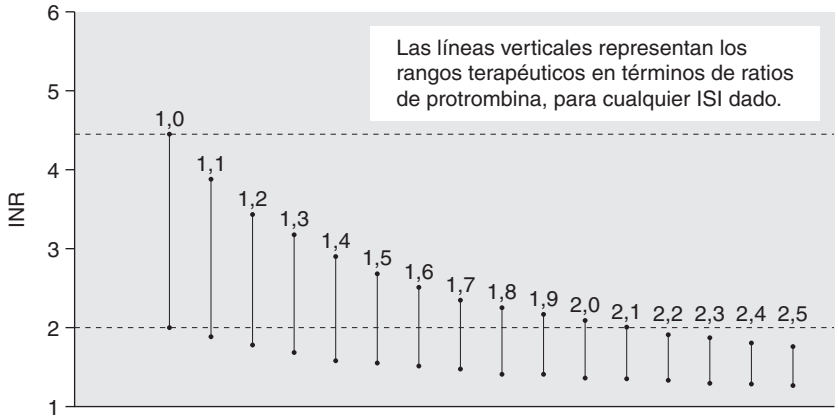


Figura 18.3. **Ratios obtenidas con tromboplastinas con valores ISI dados equivalentes a un rango terapéutico de INR 2,0–4,5.** (Ligeramente modificado de Poller L 1987. Oral anticoagulant therapy. En: Bloom AL, Thomas DP [eds.]. Haemostasis and thrombosis, 2.ª ed. Churchill Livingstone, Edimburgo. Con autorización de los editores y la editorial.)

boratorio local para entrenar al personal y para supervisar el programa de control de calidad. Debe existir un procedimiento definido para controlar cualquier problema con el rendimiento de los instrumentos, así como para remitir a los centros de especialidades a aquellos pacientes que sean difíciles de controlar[8,9].

La autoadministración del tratamiento con warfarina, semejante a la monitorización en casa de la glucosa, podría ser un procedimiento eficaz en el punto de atención para determinados pacientes. Deberían asistir primero a dos o más sesiones de formación en el uso y control de calidad del analizador apropiado, en la interpretación de la INR en lo que se refiere a ajustar su propia dosis de warfarina, y recibir unos consejos acerca de cuándo es necesario acudir a un especialista clínico[10] (v. pág. 542).

TRATAMIENTO CON HEPARINA

La acción anticoagulante de la heparina es principalmente el resultado de su capacidad para unirse a la antitrombina (AT), y, por tanto, de acelerar y potenciar la tasa de inhibición de esta última de las principales enzimas de coagulación (p. ej., factores IIa y Xa y en menor medida IXa, XIa y XIIa). Los dos efectos principales de la heparina son el efecto AT y el anti-Xa; estos dos efectos dependen de forma diferente del tamaño de la molécula de heparina. La secuencia mínima básica que se necesita para obtener actividad anticoagulante se identifica como una unidad pentasacárida. De las moléculas que contienen este pentasacárido, aquellas que constan de menos de 18 unidades de sacáridos y son de peso molecular menor de 5.000 sólo pueden aumentar la actividad inhibidora de la AT frente al Xa. Por el contrario, las cadenas más largas pueden aumentar la actividad de la AT por medio de la formación de

Tabla 18.1. Intervalos terapéuticos equivalentes a una INR de 2,0–4,0 utilizando diferentes tromboplastinas comerciales. (Modificado de Poller L 1987 Oral anticoagulant therapy. En: Bloom AL, Thomas DP [eds.]. Haemostasis and thrombosis, 2.ª ed. Churchill Livingstone, Edimburgo, p. 870.)

Tromboplastina	ISI	Ratios equivalentes a una INR 2,0–4,0
Thrombotest	1,03	2,0-3,8
Thromborel	1,23	1,7-3,1
Dade FS	1,35	1,65-2,8
Simplastin	2,0	1,3-2,0
Boehringer	2,1	1,35-1,9
Otro	2,3	1,3-1,8

INR, Ratio Normalizada Internacional; ISI, Índice de Sensibilidad International.

Tabla 18.2. Recomendaciones para el manejo del sangrado y de una excesiva anticoagulación

3,0 < INR < 6,0 (objetivo INR 2,5)	1. Reducir la dosis de warfarina o suspender
4,0 < INR < 6,0 (objetivo INR 3,5)	2. Recomenzar con la warfarina cuando el INR < 5,0
6,0 < INR < 8,0 Sin sangrado o con sangrado menor	1. Suspender la warfarina 2. Recomenzar cuando INR < 5,0
INR > 8,0 Sin sangrado o con sangrado menor	1. Suspender la warfarina 2. Recomenzar con la warfarina cuando el INR < 5,0 3. Si hay otros factores de riesgo de sangrado, administrar 0,5-2,5 mg de vitamina K (v.o. o i.v.)
Sangrado mayor	1. Suspender la warfarina 2. Administrar concentrado de complejo de protrombina 15 ml/kg de PFC 50 UI/kg 3. Administrar 5 mg de vitamina K (v.o. o i.v.)

INR, Ratio Normalizada Internacional; PFC, plasma fresco congelado.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

un complejo terciario que se une tanto a las moléculas de AT como a las de trombina.

Por lo tanto, la heparina de bajo peso molecular (HBPM), que tiene una masa molecular media de 5.000 Da, tiene una proporción del efecto de anti-Xa frente a la antitrombina de 2-5 comparada con la heparina no fraccionada (HNF), cuyo efecto se define como 1 1. Sin embargo, todas las preparaciones de heparina son mezclas heterogéneas de moléculas de distinto peso molecular, muchas de las cuales no contienen la secuencia crucial de pentasacáridos. La heparina también produce un cierto efecto anticoagulante promoviendo la liberación del inhibidor de la vía del factor tisular (IVFT) de la superficie del endotelio (v. pág. 331).

Selección de los pacientes

Es aconsejable llevar a cabo las pruebas de primera línea de hemostasia, tal como se describe en el capítulo 16, antes de empezar con el tratamiento. En presencia de un recuento plaquetario disminuido o de una coagulación alterada, la heparina podría estar contraindicada o, si se usa, la dosis debería reducirse.

Control de laboratorio del tratamiento con heparina[11]

La farmacocinética de la heparina es extremadamente complicada, en gran medida debido a las variaciones en el tamaño de la molécula. Las moléculas grandes se aclaran rápidamente por un mecanismo celular saturable y se unen a numerosas proteínas de fase aguda tales como el factor de Von Willebrand y la fibronectina. Las moléculas más pequeñas se aclaran por una ruta renal no saturable y se unen en menor medida a las proteínas plasmáticas. Como resultado, las dosis terapéuticas de HNF producen un grado variable de anticoagulación y requieren un control estrecho (tabla 18.3). Esta relación dosis-respuesta es mucho más predecible para la HBPM, y la mayoría de los estudios no han monitorizado la terapia con estos agentes, que simplemente se administran sobre la base de «unidades por kg». Por tanto, la estrategia del control del tratamiento con heparina varía según el tipo de heparina usada y las circunstancias clínicas.

La terapia profiláctica, tanto con HNF como con HBPM, se administra mediante inyección subcutánea y normalmente no se controla. Sin embargo, la HBPM se debe monitorizar en algunas circunstancias en las que se espera que la farmacocinética pueda estar alterada, como puede ser durante el embarazo o en el fracaso renal. Se toma una muestra de sangre 2-4 h después de la inyección para detectar el pico del nivel de heparina. Algunos autores también determinan los niveles valle previos a la inyección.

El tratamiento terapéutico con HNF se administra en perfusión intravenosa continua y se monitoriza normalmente usando el TTPA, que se repite 6 h después de cualquier cambio en la dosis. De manera excepcional se administra HNF dos veces al día mediante inyección subcutánea, en cuyo caso se deben tomar muestras para su estudio en el momento intermedio entre dos inyecciones. Si se sospecha resistencia a la heparina, entonces se debería llevar a cabo un ensayo anti-Xa.

El tratamiento terapéutico con HBPM no se monitoriza, excepto cuando se prevea que la relación dosis-respuesta pueda estar alterada, como en el caso de embarazadas, niños o fallo renal. La HBPM tiene relativamente poco efecto en el TTPA y, si se necesita monitorización, se debe realizar un ensayo específico para la heparina. Los resultados se presentan como actividad de heparina en forma de UI/ml. En general, a menos que se especifique lo contrario, esto se mide como actividad anti-Xa. Disponemos actualmente de un estándar internacional para la HBPM[12].

Es importante resaltar que los niveles terapéuticos de HBPM no deben producir ninguna prolongación del TP, TTPA o del TT. La curva de dosis-respuesta del TT es demasiado abrupta como para poder utilizarla en la monitorización de la terapia con heparina. Sin embargo, es muy sen-

Tabla 18.3. Pruebas usadas en el control de laboratorio del tratamiento con heparina

Prueba	Ventajas	Inconvenientes
Tiempo de coagulación en sangre total	Sencillo, barato, no se necesita equipamiento	Requiere mucho tiempo, sólo se puede desarrollar a la cabecera del paciente, uno cada vez, no es sensible a <0,4 UI ni a HBPM
TTPA	Sencillo, se pueden realizar muchas pruebas en paralelo	No todos los reactivos son sensibles a la heparina, no son sensibles a <0,2 UI ni a heparinas de BPM, se afecta por otras variables distintas a la heparina
TT	Sencillo, se pueden realizar muchas pruebas en paralelo	No es sensible a <0,2 UI ni a HBPM
Neutralización de la protamina	Sensible a todas las concentraciones	Requiere mucho tiempo y no es sensible a HBPM
Análisis anti-Xa	Sensible a todas las concentraciones y a HBPM	Caro si se utilizan los equipos comerciales; precisa mucho tiempo si se utilizan reactivos no comerciales

HBPM, heparinas de bajo peso molecular; TT, tiempo de trombina; TTPA, tiempo de tromboplastina parcial activado.

sible a la presencia de HNF y es un indicador de laboratorio útil para determinar su presencia.

Tiempo de tromboplastina parcial activado para la monitorización de la heparina

Principio

El TTPA es en la actualidad la prueba más ampliamente utilizada para monitorizar la terapia con heparina no fraccionada[6]. Es muy sensible a la heparina, pero tiene una serie de inconvenientes que deben ser tenidos en cuenta. En primer lugar, los diferentes reactivos del TTPA tienen distinta sensibilidad a la heparina. Es importante establecer que el reactivo usado tenga una reacción lineal entre los tiempos de coagulación y la concentración de heparina en el intervalo terapéutico (0,3-0,7 UI/ml). En la figura 18.4 se muestran ejemplos de distintas respuestas. El resultado se expresa como una razón entre el tiempo obtenido y el de la reserva normal que no contenía heparina (normalmente denominado «ratio de heparina»).

El segundo inconveniente del TTPA en el control del tratamiento con heparina es que el TTPA se ve afectado por una serie de variables que no se relacionan con la heparina. Las más importantes son la concentración de fibrinógeno y de factor VIII:C y la presencia de productos de degradación de la fibrina/fibrinógeno (PDF). Cuando estos factores están alterados, puede haber una disociación entre el TTPA y el nivel de heparina, lo que origina una «aparente resistencia a la heparina». En estas circunstancias se debe llevar a cabo un estudio de la heparina. Por último, el uso del TTPA puede quedar invalidado por la presencia de inhibidores, la deficiencia de factores (incluyendo por enfermedad hepática) o cualquier otro fármaco con acción activa sobre la coagulación. En pacientes gravemente enfermos, una prolongación significativa del TTPA puede ser resultado de una coagulación intravascular diseminada (CID) o de hemodilución, lo que producirá una impresión equivocada de efecto heparínico.

Reactivos y método

Los reactivos y el método se describen en la página 343.

Intervalo terapéutico

El intervalo terapéutico de la heparina se encuentra entre 0,3 y 0,7 UI/ml mediante análisis anti-Xa y 0,2-0,4 unidades mediante titulación de la protamina. La prolongación del TTPA que se alcanza a estas concentraciones varía según los reactivos, dependiendo de los reactivos y del coagulómetro utilizado. Los resultados se deben expresar como tiempo de coagulación en segundos o como una ratio. Para la mayoría de los reactivos sensibles, ratios de 1,5-3,0 cubren el rango terapéutico, pero esto se debe determinar para cada reactivo y, de manera ideal, para cada lote de reactivos. Es importante usar las muestras de pacientes tratados con heparina para la calibración, porque esto da resultados significativamente diferentes de aquellos obtenidos cuando el plasma normal se «carga» con heparina. El análisis de regresión se usa para determinar el rango normal, y se puede obtener un ajuste más fino usando valores de TTPA transformados de forma logarítmica.

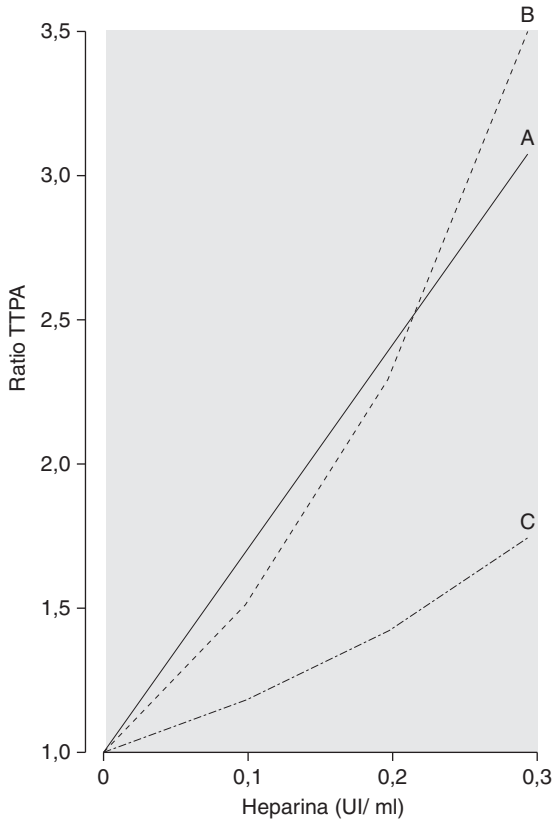


Figura 18.4. Respuesta del TTPA a la heparina añadida al plasma *in vitro*. La respuesta TTPA se expresa como una ratio (TTPA de plasma heparinizado/TTPA de plasma sin heparina). Se muestran tres reactivos y métodos diferentes. (Ligeramente modificado de Thomson JM [ed.]. 1985. Blood coagulation and haemostasis. A practical guide. Churchill Livingstone, Edimburgo, p 370. Con autorización del editor y la editorial.)

Monitorización de la heparina a la cabecera del paciente[13]

El tiempo de coagulación activada (TCA) de sangre total se usa de manera rutinaria para valorar los efectos de la heparina durante la cirugía cardíaca. Sin embargo, el TCA no es un análisis específico para la heparina, y puede verse influenciado por numerosos factores tales como la hipotermia, la hemodilución o la disfunción plaquetaria. Por estas razones, el TCA puede ser engañoso para la correcta administración de heparina y protamina.

Principio

El TCA se determina usando uno de los muchos activadores de la cascada de coagulación, como el caolín o la celita (activador de diatomáceas terrestres), y con un método de detección de producto final como el óptico o el electromagnético. No se añaden fosfolípidos adicionales.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Los monitores de TCA incluyen los *Hemochron ACT monitors* (International Technidyne, Inc, Edison, Nueva Jersey) y el *HemoTec Automated Coagulation Timer* (HemoTec, Inc., Englewood, CO). El monitor Hemochron ACT utiliza 2,0 ml de sangre total en tubos de cristal con celita. El monitor HemoTec ACT usa 0,8 ml de sangre total en cámara dual, con cartuchos de caolín de alto rango. El TCA es, por tanto, un sistema que conlleva poca participación del laboratorio.

Análisis anti-Xa para la heparina

Principio

La actividad plasmática anti-Xa como resultado de la antitrombina se ve potenciada por la adición de heparina, y se pueden adaptar tanto los ensayos de coagulación como los amidolíticos (cromogénicos) para medir este efecto. Se construye una curva estándar con la adición de cantidades variables de heparina a una muestra de plasmas normales, que será la fuente de antitrombina. Se añade luego una cantidad conocida de Xa y, tras la incubación, la cantidad de Xa restante se estudia mediante análisis cromogénicos o basados en la coagulación. Se usan una serie de equipos comerciales como el Heptest y el Hepaclot, así como varios equipos basados en sustratos cromogénicos, para obtener respuestas lineales y reproducibles. Se debe construir una curva estándar que sea apropiada para cada nivel de heparina esperado. Algunos, aunque no todos los ensayos, añaden una fuente externa de antitrombina a las muestras de la prueba, pero aún no está clara la importancia que puede tener esto en pacientes con bajos niveles de antitrombina.

Método cromogénico

Los análisis se desarrollan tal y como se indica en el equipo. La concentración de heparina se estima de la curva estándar obtenida según las instrucciones del fabricante.

Método de anticoagulación

Principio

La actividad anti-Xa de la antitrombina III se ve potenciada por la acción de la heparina. La inhibición del factor Xa por la heparina se mide en un ensayo de factor X modificado.

Reactivos

Mezcla de plasmas normales. De 20 donantes.

Plasma del paciente. Se debe recoger el plasma pobre en plaquetas (PPP) citratado entre 2 y 4 h después de la inyección de heparina; se debe analizar tan pronto como sea posible tras la extracción, o mantenerlo a 4 °C o en hielo picado hasta que se realice el estudio.

Tampón. 30 vol. de citrato trisódico, 150 volúmenes de tampón glioxalino (v. pág. 341) y 1 volumen de albúmina bovina al 20%.

Plasma comercial artificial deficitario en factor X. Reconstituir según las instrucciones.

Sustitutos plaquetarios. Mezclar a volúmenes iguales plasma deficiente en factor X y sustitutos de plaquetas. Éste es el reactivo de trabajo y se almacena a 37 °C.

Factor Xa. Reconstituir según las instrucciones del fabricante. Diluir posteriormente en el tampón para obtener una dilución 1:100. Mantener en hielo picado hasta su utilización.

Heparina. 1.000 UI/ml. Diluir en NaCl 9 g/l hasta 10 UI/ml. Lo ideal sería usar el mismo lote de heparina que está recibiendo el paciente.

$CaCl_2$. 0,025 mol/l.

Método

La curva estándar se construye como se muestra en la tabla 18.4. Añadir 0,05 ml de cada dilución a 0,45 ml de la mezcla de plasmas normales. Esto nos dará concentraciones finales de heparina de 0,05 a 0,30 UI/ml en escalones de 0,05 UI.

Pipetear 0,3 ml de factor X diluido en un tubo de cristal grande a 37 °C.

Añadir 0,1 ml de la primera dilución estándar. Poner en marcha el cronómetro. A 1 min y 30 s, transferir por duplicado 0,1 ml de la mezcla en dos tubos, cada uno de los cuales debe contener 0,1 ml de $CaCl_2$ precalentado.

Dos minutos después de obtener esta submuestra, añadir 0,2 ml de la mezcla del plasma deficiente en factor X y los sustitutos plaquetarios, poner en marcha el cronómetro, mezclar y anotar el tiempo de coagulación.

Repetir para cada dilución del estándar. La muestra del paciente se analiza sin diluir en el plasma normal almacenado si el tiempo de coagulación es superior al tiempo empleado para construir la curva estándar.

Cálculo

Trazar los tiempos de coagulación frente a la concentración de heparina en papel gráfico logarítmico-lineal, con los tiempos de coagulación en el eje lineal. La concentración de heparina de la muestra del paciente se puede leer directamente de la curva estándar. Si es necesario, habrá que multiplicarlo por el factor de dilución.

Tabla 18.4. Preparación de la curva estándar para un análisis anti-Xa

	Tubo					
Reactivo	1	2	3	4	5	6
Heparina (10 UI/ml)	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30
Solución salina (ml)	0,95	0,90	0,85	0,80	0,75	0,70
Concentración de heparina (UI/ml)	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
Concentración final de heparina tras la adición de plasma normal	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30

Prueba de neutralización con protamina

Principio

Esta prueba es una prolongación del TT, añadiendo diversas cantidades de sulfato de protamina al plasma antes de añadir trombina. Cuando toda la heparina disuelta en el plasma se haya neutralizado, el tiempo de coagulación debería ser normal. La cantidad de heparina presente en el plasma se puede calcular en función de la cantidad de sulfato de protamina necesario para producir este efecto. La prueba de neutralización con protamina se usa principalmente para calcular la dosis necesaria de sulfato de protamina para neutralizar la heparina circulante tras cirugía cardiopulmonar o hemodiálisis, pero también se usa en el control del tratamiento o para calcular la dosis de protamina que se debe administrar en caso de que el paciente necesite una reversión rápida de la heparinización.

Reactivos

Sulfato de protamina

Preparar diluciones (0-50 mg/ml) en tampón barbital, pH 7,4. Diluir 5 ml de sulfato de protamina (10 g/l) 1:20 con tampón para dar 1 dl de una solución madre que contenga 500 µg/ml. Hacer entonces soluciones de trabajo para cubrir el rango de 0-500 µg/ml en escalones de 50 µg de la solución madre mediante dilución en el tampón. Las soluciones se pueden guardar indefinidamente a 4 °C.

Trombina

Diluir la trombina en tampón barbital hasta una concentración de NIH de alrededor de 20 U/ml. Ajustar la concentración de manera que 0,1 ml de trombina coagulen 0,2 ml de plasma normal a 37 °C en 10 ± 1 s. Mantener la trombina en un tubo de plástico en hielo derretido durante el análisis.

Plasma

PPP citrado del paciente.

Método

Colocar 0,2 ml del plasma problema y 20 µl de tampón barbital en un tubo de cristal, mantenido en un baño a 37 °C. Dejar que la mezcla se caliente y entonces añadir 0,1 ml de trombina. Anotar el tiempo de coagulación. Si es de alrededor de 10 s, no hay heparina demostrable en el plasma. Si el TT está prolongado, repetir la prueba usando 20 µl de una solución de protamina 500 µg/ml en lugar del tampón. Repetir la prueba, si es necesario, hasta dar con una concentración de protamina que nos dé un tiempo de coagulación de unos 10 s.

Cálculo

Si 20 µl de sulfato de protamina 150 µg/ml nos dan un TT normal (mientras que el tiempo de coagulación se ve prolongado con 100 µg/ml de protamina), la concentración de 15 µg de protamina será suficiente para neutralizar la heparina de 1 ml de plasma. Si se asume una neutralización peso por peso, el plasma del paciente contiene 15 µg de heparina por mililitro o 1,5 UI, asumiendo también que 1 mg de heparina equivale a 100 UI. Esta cifra puede ser convertida posteriormente a concentración de heparina por mililitro de sangre total multiplicando por 1 – Hto.

En el ejemplo anterior, para conseguir una neutralización *in vivo* de la heparina mediante sulfato de protrombina, asumiendo un volumen total de 75 ml/kg de peso corporal, la dosis requerida de protamina sería la siguiente:

$$\frac{[15 \times 75 \times \text{peso corporal} \times (1 - \text{Hto})\ \text{mg}]}{1.000\ \text{mg}}$$

Trombocitopenia inducida por heparina

Muchos pacientes tratados con heparina no fraccionada sufren una leve e inmediata disminución del número de plaquetas. Esto se denomina trombocitopenia inducida por heparina (TIH) de tipo I, y es completamente benigna. Se cree que aparece como resultado de la unión de la heparina a las plaquetas. Un segundo tipo de trombocitopenia, más grave (TIH tipo II), aparece en aproximadamente el 5% de los pacientes que reciben HNF y es el resultado del desarrollo de anticuerpos contra los complejos FP4-heparina. Éstos se unen y activan las plaquetas vía FCRγII, dando como resultado un aclaramiento acelerado. La TIH tipo II se desarrolla a los 5-12 días después de comenzar la terapia con heparina, y provoca un marcado descenso del número de plaquetas, hasta un 50% menos del valor preheparina y normalmente inferior a 50×10^9/l. El proceso de activación a veces desemboca en la formación de trombos plaquetarios arteriales y venosos, especialmente en pacientes graves o sépticos, y también se han notificado necrosis cutáneas. El síndrome de trombocitopenia y trombosis inducidas por heparina (TTIH) se asocia a una mortalidad elevada. Debe suspenderse la heparina al instante y suministrarse una anticoagulación alternativa que actúe inmediatamente[14].

El diagnóstico de TIH es principalmente clínico y no existe ninguna prueba que se pueda llevar a cabo con suficiente rapidez, sensibilidad y especificidad para ser útil a la hora de decidir rápidamente si se suspende la heparina. Sin embargo, es útil tener información de confirmación, y pueden llevarse a cabo numerosas pruebas para apoyar el diagnóstico[15]. Éstas pueden ser tanto pruebas *funcionales*, en las cuales se detecta la activación de las plaquetas, como pruebas *inmunológicas*, en que se detectan anticuerpos dependientes de la presencia de FP4-heparina. Un ejemplo de lo anterior sería el que se conoce como el patrón oro, la prueba de liberación de serotonina[16], pero es bastante incómodo e inconveniente de realizar para un uso rutinario. Las alternativas podrían ser las pruebas basadas en la agregación plaquetaria inducida por heparina y las pruebas basadas en la citometría de flujo[17,18]. El análisis rutinario más simple consiste en una prueba de agregación plaquetaria modificada, como se describe en el siguiente apartado. Las pruebas inmunológicas incluyen el análisis

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), que es también un inmunoanálisis de gel de partículas[19]. Aunque las pruebas inmunológicas parecen tener mayor sensibilidad y ser más fácilmente reproducibles, no demuestran el significado funcional de los anticuerpos.

Trombocitopenia inducida por heparina: detección mediante agregación plaquetaria

La adición de heparina al PPP del paciente da como resultado complejos FP4/heparina, que se unen al anticuerpo patológico. Los complejos anticuerpo-FP4/heparina se unen a las plaquetas y las activan. La activación plaquetaria es detectada como una agregación.

Principio

La sangre se centrifuga para obtener un plasma rico en plaquetas (PRP), el cual se agita en una cubeta a 37 °C entre una fuente de luz y una fotocélula.

Reactivos

Plasma rico en plaquetas (PRP) normal de control

Se debe usar preferentemente sangre del grupo O o del mismo grupo que el paciente. Para ver el método, véase la página 366. Se cuenta el número de plaquetas del PRP. El número de plaquetas influirá en la respuesta de agregación si el recuento cae fuera del intervalo de 200-400 × 10^9/l. Si es necesario, habrá que ajustar el PRP hasta dar un recuento plaquetario de 300 × 10^9/l mediante la dilución con el plasma de control pobre en plaquetas (PPP).

El PPP del paciente y de control normal se obtiene mediante la centrifugación a 2.000 g durante 20 min. Comprobar que el número de plaquetas sea cero.

Heparina

Se necesita una muestra del mismo tipo de heparina (mismo lote) que se le ha administrado previamente al paciente. La heparina se diluye hasta dar concentraciones operativas de 10 y 20 UI/ml (concentración final de 1,0 y 2,0 UI/ml).

Método

Siguiendo el esquema que se muestra en la tabla 18.5, se preparan cuatro cubetas de agregación. Añadir 300 µl de PRP normal a cada cubeta. Añadir después 200 µl del PPP de control o del paciente adecuado, junto con una barra de agitación magnética. Fijar la línea basal del 100% con el PPP normal de control, y la línea basal del 0% con el PRP y el PPP. Fijar la tasa de revoluciones a 1.200 rpm. Observar las líneas basales en el minuto 1. Iniciar la agregación mediante la adición de 50 µl de heparina o de solución salina. Observar la agregación durante un mínimo de 15 min (fig. 18.5).

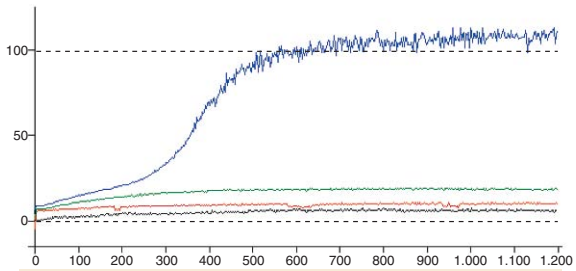
Interpretación

1. Si se observa agregación en la cubeta 4, con una concentración final de heparina de 1,0 y 2,0 UI/ml, se repite la prueba utilizando plaquetas normales, plasma del paciente y una concentración final de heparina de 0,2 UI/ml.
2. La agregación observada sólo en la cubeta 4, con la subsiguiente demostración de la heparina a una concentración final de 0,2 UI/ml, se considera positiva para una agregación plaquetaria inducida por heparina.
   Como alternativa, se puede repetir la agregación con una concentración final de heparina mucho más alta (10 UI/ml). La inhibición de la agregación sugiere una agregación plaquetaria inducida por heparina.
3. La agregación observada en la cubeta 4 sin demostrar agregación con una concentración menor de heparina se considera cuestionable.
4. La agregación observada en las cubetas 1, 2 o 3 indica que la reacción puede deberse a una causa distinta de la agregación plaquetaria inducida por heparina y se repe-

Tabla 18.5. Combinaciones de plaquetas, plasma y heparina requeridas para analizar la trombocitopenia inducida por heparina

	Cubeta 1	Cubeta 2	Cubeta 3	Cubeta 4
PRP de control normal	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl
PPP del paciente	Ninguna	200 µl	Ninguna	200 µl
PPP de control normal	200 µl	Ninguna	200 µl	None
Heparina (10 o 20 UI/ml)	Ninguna	Ninguna	50 µl	50 µl
Solución salina (0,85%)	50 µl	50 µl	Ninguna	Ninguna

PPP, plasma pobre en plaquetas; PRP, plasma rico en plaquetas.



	Negro	Verde	Rojo	Azul
PRP de control normal	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl
PPP del paciente	None	200 µl	Ning.	200 µl
PPP de control normal	200 µl	Ning.	200 µl	Ning.
Heparina (10 o 20 UI/ ml)	Ning.	Ning.	50 µl	50 µl
Solución salina (0,85%)	50 µl	50 µl	Ning.	Ning.

Figura 18.5. Las combinaciones de plaquetas, plasma y heparina requeridas para analizar la trombocitopenia inducida por heparina se muestran en la tabla 18–5. El trazado de la agregación muestra que la agregación plaquetaria sólo tiene lugar cuando el plasma del paciente se expone a la heparina (trazo azul).

tirá la prueba usando diferentes donantes normales de plaquetas y diferente PPP de control.

Con la experiencia, la valoración subjetiva de la respuesta de agregación es por lo general suficiente para la interpretación clínica. En la figura 18.5 se muestra un resultado positivo de la prueba. Se puede informar de la magnitud total de agregación observada.

Problemas técnicos

Véase la sección sobre la agregación plaquetaria (página 366).

La bibliografía publicada sugiere que la sensibilidad de la prueba puede aumentarse con el uso de las propias plaquetas del paciente, con plaquetas seleccionadas de donantes que se sepa que reaccionan en el análisis, o con plaquetas lavadas. La reactividad de las plaquetas del donante se puede establecer usando un suero positivo conocido. La especificidad de la prueba se puede aumentar usando el análisis de dos puntos, que incluye la neutralización de la reacción mediante una dosis alta de heparina.

Prueba Diamed de detección de anticuerpos heparina–FP4

La prueba Diamed de detección de anticuerpos heparina-FP4 es un inmunoensayo de gel de partículas, que consiste en partículas de polímeros de color rojo cubiertas con el complejo heparina-FP4. Cuando el suero del paciente se mezcla con las partículas de polímeros, los anticuerpos específicos reaccionan con el complejo heparina-FP4 sobre la superficie de la partícula, dando como resultado la aglutinación de las partículas. Las partículas se centrifugan a través de una matriz de filtración de gel; las partículas aglutinadas se atrapan en la parte superior del gel o en su interior, y las partículas no aglutinadas forman un botón en la parte inferior del tubo. El resultado se puede apreciar visualmente.

Hirudina

La hirudina recombinante elaborada está actualmente disponible y autorizada tanto para uso terapéutico como profiláctico en ciertas indicaciones. Es un inhibidor directo de la trombina y se administra por vía intravenosa o subcutánea. Se monitoriza de manera más sencilla usando el TTPA con el mismo intervalo deseado que para la heparina. El TT puede prolongarse y se corregirá con reptilase. Una medida alternativa es el tiempo de coagulación de la ecarina. Se cree que es más preciso a altas dosis de hirudina, pero puede dar resultados engañosamente altos cuando la cantidad de protrombina de la muestra se ha reducido por debajo del 50%. También es útil cuando otros factores, como los anticuerpos antifosfolípidos, están originando prolongación del TTPA.

Tras 5 días de terapia, el 45% de los pacientes desarrollarán anticuerpos antihirudina, los cuales pueden aumentar o reducir el efecto terapéutico. La hirudina se excreta por vía renal, y se necesita una estrecha monitorización, con reducción de la dosis, si hay alteración renal.

TERAPIA TROMBOLÍTICA

Los agentes trombolíticos usados actualmente son principalmente la estreptocinasa y el activador de plasminógeno tisular recombinante (ATP-r). La tenecteplasa y la reteplasa son formas genéticamente modificadas de ATP.

Estreptocinasa

La estreptocinasa es una fracción purificada del filtrado procedente de cultivos de *Streptokinase haemolyticus*. La estreptocinasa interacciona con el plasminógeno o la plasmina para formar un activador del plasminógeno en el plasma. El complejo activador a su vez disocia un enlace en la molécula de plasminógeno para producir plasmina libre. La estreptocinasa, por tanto, origina fibrinólisis sistémica y lisis del coágulo de fibrina. La estreptocinasa es una proteína extraña e induce la producción de anticuerpos en humanos, limitándose el ciclo de tratamiento a 3-5 días. Se recomienda un período de descanso de 2 años antes de repetir la administración de estreptocinasa. Presenta también reacción cruzada con los anticuerpos antiestreptococo, los cuales pueden originar resistencia a la terapia, aunque esto se soluciona habitualmente con dosis muy altas.

Activador de plasminógeno de tipo tisular

El activador de plasminógeno de tipo tisular es una cadena de polipéptidos única o doble obtenida mediante técnicas de recombinación o de cultivos tisulares. Es un potente activador del plasminógeno cuando las dos moléculas se unen a la fibrina, por la que tiene una gran afinidad. Causa, por tanto, menos fibrinogenólisis sistémica que cualquiera de los agentes previamente mencionados, aunque existe una cierta disminución del fibrinógeno circulante, particularmente en una administración prolongada. Induce un estado trombolítico de mayor duración que la perfusión tanto de estreptocinasa como de urocinasa.

Selección de pacientes

El tratamiento trombolítico conlleva un riesgo serio de sangrado, y no se deben administrar los agentes trombolíticos a aquellos individuos que padezcan enfermedades en las que haya un alto riesgo de sangrado. Además, en cada paciente se debería medir la función hemostática y la cifra de plaquetas antes de comenzar el tratamiento.

Control de laboratorio de la terapia trombolítica[20]

Numerosas pruebas de laboratorio se alteran durante la terapia trombolítica, pero no se dispone de un procedimiento de monitorización perfecto y específico. En la práctica, la terapia trombolítica se administra rápidamente según el protocolo, sin tiempo ni necesidad de ajustar la dosis. Durante la terapia trombolítica, todas las pruebas del estudio básico de la coagulación se prolongan, lo que refleja el estado hiperplasminémico, con una reducción de la concentración de fibrinógeno y la presencia de PDF. La prolongación es más evidente con la estreptocinasa y con el complejo estreptocinasa-plasminógeno, es menos evidente

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

con la urocinasa y es mínima con el ATP. La concentración de plasminógeno desciende por lo general hasta valores por debajo de 0,05 g/l, y la concentración de PDF puede aumentar hasta más de 1.000 ng/l.

La monitorización de la terapia sólo se recomienda para tratamientos que duren mas de 24 h. Si es posible, se debería obtener una muestra antes de comenzar el tratamiento. Las muestras obtenidas tras el comienzo de la fibrinólisis se deben mantener en citrato junto con un inhibidor de la fibrinólisis como la aprotinina (250 UI/ml) o el ácido ε-aminocaproico (EACA: 0,07 mol/l). El estado fibrinolítico afectará a numerosas pruebas.

Tiempo de tromboplastina parcial activado

Con una fibrinólisis efectiva, es probable que el TTPA se prolongue más de 1,5 veces el control. Esto es el resultado de una depleción de fibrinógeno, FV y FVIII, y una interferencia con los PDF. No hay, sin embargo, ningún dato que correlacione el TTPA con el efecto terapéutico.

Tiempo de trombina

El TT se puede usar para monitorizar la terapia. Unas horas después de comenzar la perfusión, el TT se prolonga a 40 s o más (control 15 ± 1 s), entonces se fija a aproximadamente 20-30 s. TT muy largos conllevan un alto riesgo de sangrado y son indicativos de una hiperplasminemia grave.

Fibrinógeno plasmático

Dependiendo de la duración de la terapia y del activador del plasminógeno específico utilizado, se produce un descenso variable en el fibrinógeno. Se debe medir el fibrinógeno con un método que dependa del fibrinógeno coagulable (p. ej., la técnica de Clauss, pág. 344). El fibrinógeno derivado del TP es probable que no sea muy fiable. Se podrán evaluar los productos de degradación de la fibrina (fibrinógeno), pero es improbable que sirvan de ayuda.

Estudio del paciente que sangra mientras toma agentes trombolíticos o inmediatamente después

La hemorragia es un riesgo inevitable asociado a la terapia fibrinolítica y puede ocurrir a pesar de tener pruebas de coagulación normales. Cuando es grave, el sangrado necesitará el cese de la fibrinólisis y la administración de aprotinina o de ácido tranexámico para inhibir su actividad. Las pruebas de coagulación pueden guiar en la terapia de sustitución con plasma o con crioprecipitados. Las pruebas, el tiempo y el mecanismo más probable de sangrado se muestran en la tabla 18.5.

TERAPIA ANTIPLAQUETARIA

Muchos fármacos inhiben la función antiplaquetaria *in vitro*, pero sólo unos pocos tienen actividad antiplaquetaria a dosis aceptables. Cada categoría de fármacos tiene una acción farmacológica diferente y requiere métodos diferentes para demostrar su efecto sobre las plaquetas. Los agentes antiplaquetarios se usan en la prevención primaria y secundaria de la enfermedad coronaria, la angina inestable y ciertas formas de enfermedad cerebrovascular, para prevenir un troboembolismo asociado a patología valvular o a válvulas cardíacas protésicas, y para prevenir trombosis en las derivaciones arteriovenosas. Pocas veces se requiere a un hematólogo para monitorizar estos aspectos de la terapia antiplaquetaria. De hecho, se dice que la ventaja de estos agentes es que la monitorización es innecesaria.

El interés ha resurgido debido a la observación de que algunos pacientes no responden a la aspirina. La «resistencia a la aspirina» está vagamente definida y se puede referir tanto al fracaso en la inhibición de la función plaquetaria como al fallo en la supresión de la producción de tromboxano A_2. Este hecho se puede detectar con analizadores de la función plaquetaria como el PFA 100, o por la respuesta de la agregación plaquetaria, pudiéndose detectar esta última por los niveles en suero de tromboxano B_2. Sin embargo, la utilidad clínica de esta valoración y las respuestas apropiadas aún no han sido establecidas[21].

Un cierto porcentaje de pacientes con trombocitosis o trombocitemia experimentan episodios de trombosis arterial. A dichos pacientes se les prescribe, por lo general, fármacos antiplaquetarios, y el efecto de dichos fármacos a veces se monitoriza. Disponemos de tres técnicas para la monitorización: prolongación del tiempo de sangrado o PFA (v. pág. 358), inhibición de la respuesta de agregación plaquetaria a agonistas estándar (v. pág. 366) y normalización de la supervivencia de las plaquetas usando plaquetas marcadas con ^{111}In (v. pág. 321).

BIBLIOGRAFÍA

1. Hirsh J, Dalen JE, Anderson DR, et al 1998 Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range. Chest 114:445s–469s.
2. World Health Organization 1999 Guidelines for thromboplastins and plasma used to control oral anticoagulant therapy. WHO Technical Report Series 889:64–93.
3. World Health Organization 1999 Guidelines for thromboplastins and plasma used to control oral anticoagulant therapy. WHO Technical Report Series 889:Annex 3.
4. Kitchen S, Preston FE 1999 Standardization of prothrombin time for laboratory control of oral anticoagulant therapy. Seminars Thrombosis Hemostasis 25:17–25.
5. Poller L, Barrowcliffe TW, van den Besselaar AM, et al 1997 A simplified statistical method for local INR using linear regression. European Concerted Action on Anticoagulation [see comments]. British Journal of Haematology 98: 640–647.
6. Guidelines on oral anticoagulation, 3rd ed 1998. British Journal of Haematology 101:374–387.
7. Hirsh J, Dalen J, Anderson DR, et al 2001 Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range. Chest 119:8S–21S.

8. Shiach CR, Campbell B, Poller L, et al 2002 Reliability of point-of-care prothrombin time testing in a community clinic: a randomized crossover comparison with hospital laboratory testing. British Journal of Haematology 119:370–375.
9. Murray ET, Fitzmaurice DA, McCahon D 2004 Point pf care testing for INR monitoring: where are we now? British Journal of Haematology 127:373–378.
10. Fitzmaurice D, Murray ET, Gee KM, et al 2002 Training of patients in a randomised controlled trial of self management of warfarin treatment. British Medical Journal 328: 437–438.
11. Hirsh J, Warkentin TE, Raschke R, et al 1998 Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing considerations, monitoring, efficacy, and safety [published erratum in Chest 1999 Jun; 115(6):1760]. Chest 114:489s–510s.
12. Gray E, Heath AB, Mulloy B, et al 1995 A collaborative study of proposed European Pharmacopoeia reference preparations of low molecular mass heparin. Thrombosis and Haemostasis 74:893–899.
13. Popma JJ, Prpic R, Lansky AJ, et al 1998 Heparin dosing in patients undergoing coronary intervention. American Journal of Cardiology 82:19–24.
14. Warkentin TE 2003 Heparin-induced thrombocytopenia: pathogenesis and management [see comment]. British Journal of Haematology 121:535–555.
15. Chong BH 2003 Heparin-induced thrombocytopenia. Journal of Thrombosis & Haemostasis 1:1471–1478.
16. Sheridan D, Carter C, Kelton JG 1986 A diagnostic test for heparin-induced thrombocytopenia. Blood 67:27–30.
17. Warkentin TE 1999 Heparin-induced thrombocytopenia: a clinicopathologic syndrome. Thrombosis and Haemostasis 82:439–447.
18. Amiral J, Meyer D 1998 Heparin-induced thrombocytopenia: diagnostic tests and biological mechanisms. Baillieres Clinical Haematology 11:447–460.
19. Meyer O, Salama A, Pittet N, et al 1999 Rapid detection of heparin-induced platelet antibodies with particle gel immunoassay (ID-HPF4). Lancet 354:1525–1526.
20. Ludlam CA, Bennett B, Fox KA, et al 1995 Guidelines for the use of thrombolytic therapy. Haemostasis and Thrombosis Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. Blood Coagulation & Fibrinolysis 6:273–285.
21. Patrono C 2003 Aspirin resistance: definition, mechanisms and clinical read-outs [see comment]. Journal of Thrombosis & Haemostasis 1:1710–13.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

19 Antígenos y anticuerpos de las células sanguíneas: eritrocitos, plaquetas y granulocitos

Sue Knowles y Fiona Regan

Eritrocitos 413
- Antígenos de los eritrocitos 413
- Significado clínico de los aloanticuerpos de los eritrocitos 421
- Mecanismos de destrucción inmune de los eritrocitos 422
- Reacciones antígeno-anticuerpo 424
- Control de calidad en el laboratorio 425
- Puntos generales de la técnica serológica 426

Plaquetas y granulocitos 434
- Sistemas aloantigénicos de plaquetas y granulocitos 434
- Demostración de los anticuerpos de plaquetas y granulocitos 437
- Métodos de demostración de anticuerpos 439
- Determinación del genotipo molecular de los aloantígenos plaquetarios 444

ERITROCITOS

Antígenos de los eritrocitos

Desde el descubrimiento de la existencia de los grupos sanguíneos por Landsteiner en 1901, se han recogido una extensa colección de datos serológicos, genéticos y bioquímicos sobre los antígenos eritrocitarios (grupo sanguíneo). Más recientemente, se han reconocido las funciones biológicas de algunos de estos antígenos.

Hay descritos veinticinco grupos sanguíneos (tabla 19.1). Cada sistema consiste en una serie de antígenos eritrocitarios determinados por un único locus genético o por loci ligados muy estrechamente. Además de los sistemas de los grupos sanguíneos, hay cinco «colecciones» de antígenos (p. ej., Cost), que agrupan conjuntos de antígenos relacionados genética, bioquímica o serológicamente, y una serie aparte de antígenos de baja (p. ej., Rd) y alta frecuencia (p. ej., Vel), que no encajan en otros sistemas y colecciones. El grupo de trabajo International Society of Blood Transfusion (ISBT) mantiene un catálogo numérico de los antígenos de los eritrocitos[1,2].

Además de los antígenos del sistema ABO, la mayoría de los antígenos se detectaron por anticuerpos estimulados por la transfusión o el embarazo.

Las formas alternativas de codificación genética para un locus particular de los antígenos de los eritrocitos se llaman alelos, y los individuos pueden heredar alelos idénticos o no idénticos. La mayoría de los genes de los grupos sanguíneos se han asignado a cromosomas específicos (p. ej., sistema ABO en el cromosoma 9, sistema Rh en el cromosoma 1). El término genotipo se usa para la suma de los alelos heredados de un gen particular (p. ej., AA, AO, etc.), y la mayoría de los genes de los eritrocitos se expresan como antígenos codominantes (es decir, ambos genes se expresan en los heterocigotos). El fenotipo se refiere a los productos reconocibles de los alelos, y hay muchas diferencias raciales en la frecuencia de los fenotipos de los eritrocitos, como se muestra en la tabla 19.2.

Los antígenos eritrocitarios están constituidos por estructuras de carbohidratos o de proteínas. Los antígenos definidos por carbohidratos son productos genéticos indirectos (p. ej., ABO, Lewis, P, etc.). Los genes codifican para un producto intermedio, generalmente una enzima, que crea el antígeno específico mediante la transferencia de moléculas de azúcares a una proteína o un lípido. Los antígenos definidos por proteínas son productos genéticos directos, y la especificidad está determinada por la secuencia de aminoácidos heredada y/o la conformación de las proteínas. Las proteínas transportadoras de antígenos eritrocitarios están insertadas en la membrana de una de estas tres formas: un único dominio transmembrana, multidominios transmembrana o ligadas a fosfatidilinositol (ligadas a GPI). Sólo unos pocos de los antígenos de los eritrocitos son específicos de éstos (Rh, LW, Kell y MNSs); los restantes se expresan en muchos otros tejidos. La estructura y funciones de las proteínas de membrana y glucoproteínas transportadoras de antígenos del grupo sanguíneo han sido revisadas por Cartron y cols.[3] y Daniels[4]. La tabla 19.3 proporciona un ejemplo de las funciones pu-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 19.1. Sistemas de grupo sanguíneo aceptado por el grupo de trabajo de la ISBT

Número del sistema	Nombre convencional del sistema	Símbolo ISBT del sistema	Localización en cromosoma	Gen(es)
001	ABO	ABO	9q34.1-q34.2	*ABO*
002	MNS	MNS	4q28-q31	*GYPA* *GYPB*
003	P	PI	22q11.2-qter	*P*
004	Rh	RH	1p36.2-p34	*RHD* *RHCE*
005	Lutheran	LU	19q12-q13	*LU*
006	Kell	KEL	7q33	*KEL*
007	Lewis	LE	19p13.3	*FUT3*
008	Duffy	FY	1q22-q23	*FY*
009	Kidd	JK	18q11-q12	*HUT11*
010	Diego	DI	17q12-q21	*SLC4A1*
011	Yt	YT	7q22	*ACHE*
012	Xg	XG	Xp22.32	*XG*
013	Scianna	SC	1p36.2-p22.1	*SC*
014	Dombrock	DO	12p13.2-p12.1	*DO*
015	Colton	CO	7p14	*AQP1*
016	LW	LW	19p13.2-cen	*LW*
017	Chido/Rogers	CH/RG	6p21.3	*C4A,C4B*
018	H	H	19q13	*FUT1*
019	Kx	XK	Xp21.1	*XK*
020	Gerbich	GE	2q14-q21	*GYPC*
021	Cromer	CROM	1q32	*DAF*
022	Knops	KN	1q32	*CR1*
023	Indian	IN	11p13	*CD44*
024	Ok	OK	19pter-p13.2	*OK*
025	MER2	RAPH	11p15	*MER2*

ISBT, International Society of Blood Transfusion.

tativas de las moléculas que contienen antígenos del grupo sanguíneo.

Sin embargo, la principal importancia clínica de un sistema del grupo sanguíneo depende de la capacidad de los aloanticuerpos (dirigidos contra los antígenos que no posee el individuo) para causar destrucción de los eritrocitos transfundidos o de cruzar la placenta y provocar una enfermedad hemolítica al feto o al recién nacido. Esto, a su vez, depende de la frecuencia de los antígenos y los aloanticuerpos y de las características de estos últimos: amplitud térmica, clase de inmunoglobulina y capacidad para fijar el complemento. Sobre la base de estos criterios, los sistemas ABO y Rh son de gran importancia clínica. Los anti-A y anti-B se producen de manera natural y son capaces de causar una grave hemólisis intravascular después de una transfusión incompatible. El antígeno RhD es el más inmunogénico de los antígenos de los eritrocitos después del A y el B, siendo capaz de estimular la producción de anti-D tras transfusión o embarazo en la mayoría de los individuos RhD negativos.

Sistema ABO

El descubrimiento del sistema ABO por Landsteiner marcó el inicio de las transfusiones sanguíneas seguras. Los antígenos ABO, aunque son más importantes en relación con las transfusiones, también se expresan en la mayoría de las

Tabla 19.2. Frecuencias de los fenotipos eritrocitarios en poblaciones negras y blancas en los Estados Unidos

Sistema	Fenotipo	Población negra Estados Unidos (%)	Población blanca Estados Unidos (%)
ABO	O	49	43,7
	A	26	41,7
	B	20,5	10,6
	AB	4,5	4
Lewis	Le (a–b–)	28,5	6
Rh	Dce	47,8	2,1
	DCcEe	4,2	13,4
	dce	5,6	14,6
	DCe	2,6	18,9
MNSs	S–s+	68,1	45
	S+s+	24,5	44
	S+s–	5,9	11
	S–s–	1,5	Infrecuente
Duffy	Fy (a–,b–)	63,7	Infrecuente
	Fy (a–,b+)	18,8	34
	Fy (a+,b+)	2	44
	Fy (a+,b–)	15,5	17
Kidd	Jk (a+,b–)	50	27,5
	Jk (a+b+)	41,4	49,4
	Jk (a–b+)	8,6	23,1

membranas endoteliales y epiteliales y son importantes antígenos de histocompatibilidad[5]. El trasplante de órganos sólidos con incompatibilidad ABO incrementa la posibilidad de rechazo hiperagudo del injerto. El trasplante de células madres con incompatibilidad ABO mayor (p. ej., células madres del grupo A a un receptor O) provocará hemólisis, a menos que la donación esté deplecionada de eritrocitos.

Antígenos ABO y genes codificadores

Hay cuatro grupos sanguíneos principales: A, B, AB y O (tabla 19.4). En la población británica caucásica la frecuencia del grupo A es 42%, B 9%, AB 3% y O 46%, pero existe variación racial en estas frecuencias[6]. Los epítopos de los antígenos ABO están determinados por carbohidratos (azúcares), ligados a polipéptidos (formando glucoproteínas) o a lípidos (glucolípidos).

La expresión de los antígenos ABO está controlada por tres loci separados genéticamente: el *ABO* localizado en el cromosoma 9, y el *FUT1 (H)* y el *FUT2 (Se)*, ambos localizados en el cromosoma 19. Los genes de cada locus son heredados en pares como dominantes mendelianos. Cada gen codifica para una enzima diferente (glucosiltransferasa), que une monosacáridos específicos en cadenas de disacáridos precursores (tabla 19.5). Hay cuatro tipos de cadenas de disacáridos conocidas que se encuentran en los eritrocitos, en otros tejidos y en secreciones. La cadena de disacárido tipo 1 se encuentra en el plasma y en las secreciones y es el substrato para el gen *FUT2 (Se)*, mientras que las cadenas tipo 2, 3 y 4 se encuentran sólo en los eritrocitos

Tabla 19.3. Funciones putativas de las moléculas que contienen antígenos del grupo sanguíneo

Clase	Sistema grupo sanguíneo	Estructura	Función
Transportador/canal	Kidd	GP varios dominios transmembrana	Transportador de urea
	Colton	Acuaporina 1	
	Diego	CP varios dominios transmembrana	Canal de agua
		Banda 3, GP varios dominios transmembrana	Intercambiador de aniones
Receptores	Duffy	GP varios dominios transmembrana, DARC	Quimiocinas (receptor del *Plasmodium vivax*)
	Indian	GP un solo dominio transmembrana	Receptor de hialuronato
Vía complemento	Chido/Rogers	Complemento absorbido sobre los eritrocitos	Componente del complemento Regulador del complemento
	Cromer	DAF	Regulador del complemento
	Knops	Receptor 1 de complemento	
Adhesión	LW	IgSF	Une CD11/CD18 Integrinas
Molécula	Lutheran	IgSF	Receptor de laminina?
Enzima	Yt	GP ligada-GPI Acetilcolinesterasa	Desconocida en eritrocitos
	Kell	GP de un solo dominio transmembrana	Endopeptidasa?
Proteína estructural	Gerbich	Glucoforinas C y D GP de un solo dominio transmembrana	Fijación al esqueleto de la membrana

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 19.4. Sistema ABO de grupo sanguíneo

Grupo sanguíneo	Subgrupo	Antígenos en hematíes	Anticuerpos en plasma
A	A_1 A_2	A + A_1 A	Anti-B (Anti-A_1)[a]
B	—	B	Anti-A, Anti-A_1
AB	A_1B A_2B	A + A_1 + B A + B	Ninguno (Anti-A_1)[a]
O	—	(H)[b]	Anti-A Anti-A_1 Anti-B Anti-A,B[c]

[a] Anti-A_1 encontrado en el 1–2% de los sujetos A_2 y en el 25–30% de los sujetos A_2B.
[b] La cantidad de antígeno H está influida por el grupo ABO; las células O son las que tienen más sustancia H y las células A_1B son las que menos. Ocasionalmente puede encontrarse Anti-H en sujetos A_1 y A_1B (v. texto).
[c] Reactividad cruzada con células A y B.

Tabla 19.5. Glucosiltransferasas producidas por genes que codifican los antígenos en los sistemas del grupo sanguíneo ABO, H y Lewis

Gen	Alelo	Transferasa
FUT1	H h	α-2-L-fucosiltransferasa Ninguna
A	A	α-3-N-acetil-D-galactosaminiltransferasa
B	B	α-3-D-galactosiltransferasa
O	O	Ninguna
FUT2	Se se	α-2-L-fucosiltransferasa Ninguna
FUT3	Le le	α-3/4-L-fucosiltranferasa Ninguna

y son el sustrato para el gen *FUT1 (H)*. Es probable que los genes *O* y *B* surgieran por mutación del gen *A*. El gen *O* no codifica para la producción de una enzima funcional; los individuos del grupo O tienen normalmente una deleción del nucleótido 261 (el alelo *O1*), lo que resulta en un cambio en el marco de lectura, una prematura terminación del polipéptido traducido y la producción de una enzima sin actividad catalítica. El gen *B* difiere del *A* por sustituciones de nucleótidos persistentes[7]. La expresión de antígenos A y B está determinada por los genes *H* y *Se*, los cuales producen glucosiltransferasas que añaden L-fucosa, produciendo el antígeno H. La presencia de un gen *A* o *B* (o ambos) tiene como resultado la producción de glucosiltransferasas adicionales, que convierten la sustancia H en antígenos A y B por la adición terminal de N-acetil-D-galactosamina y D-galactosa respectivamente (fig. 19.1). Como el gen *O* produce una transferasa inactiva, la sustancia H persiste sin cambios como grupo O. En el extremadamente raro fenotipo Bombay Oh, el individuo es homocigoto para el alelo *h* del *FUT1*, por lo que no puede formar el precursor H de los antígenos A y B. Sus eritrocitos se clasifican como grupo O, pero su plasma contiene anti-H, además de anti-A, anti-B y anti-AB, que son todos activos a 37 °C. Como consecuencia, los individuos con un fenotipo Bombay Oh sólo pueden ser transfundidos con seguridad con otros eritrocitos Oh.

Los hematólogos han definido dos subgrupos comunes del antígeno A. Aproximadamente el 20% de los individuos del grupo A y del grupo AB pertenecen al grupo A_2 y A_2B, respectivamente; los restantes pertenecen al grupo A_1 y A_1B. Estos subgrupos surgen como resultado de herencias de los alelos A^1 o A^2. La transferasa A_2 es menos eficiente en la transferencia de N-acetil-galactosamina a los sitios disponibles del antígeno H y no puede utilizar las cadenas de disacáridos tipos 3 y 4. Como consecuencia, los eritrocitos A_2 tienen menos sitios de antígeno A que las células A_1 y el plasma de los individuos del grupo A_2 y del grupo A_2B puede también contener anti-A_1. La distinción entre estos subgrupos puede hacerse empleando lectina de *Dolichos biflorus*, que sólo reacciona con las células A_1. El contenido de antígeno H de los eritrocitos depende del grupo ABO y, cuando se valora por reacciones de aglutinación con anti-H, la fuerza de la reacción tiende a ser graduada como O > A_2 > A_2B > B > A_1 > A_1B. Ocasionalmente se encuentran otros subgrupos de A (p. ej., A_3 y A_x) que resultan de formas mutantes de las glucosiltransferasas producidas por el gen *A* y son menos eficientes para transferir N-acetil-D-galactosamina a la sustancia H[7].

Los antígenos A, B y H son detectables precozmente en la vida fetal, pero al nacimiento no están completamente desarrollados en los eritrocitos. El número de sitios antigénicos alcanza los niveles «adultos» alrededor del año de edad y se mantiene constante hasta la vejez, cuando puede ocurrir una ligera reducción.

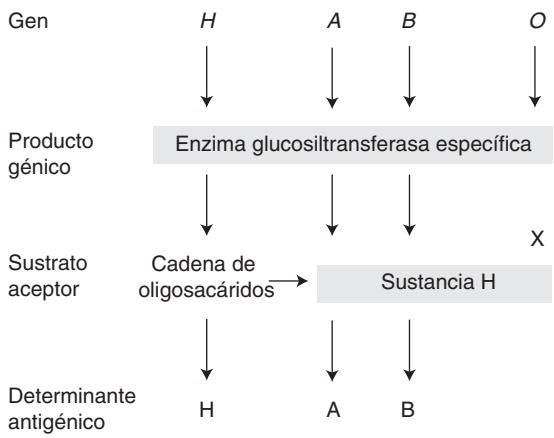


Figura 19.1. Rutas genéticas del grupo sanguíneo HAB a antígenos. *Glucosiltransferasa H transfiere a L-fucosa; A transfiere a N-acetil-D-galactosamina; B transfiere a D-galactosa; O es inactivo.

Secretores y no secretores

La capacidad de secretar sustancia A, B y H en forma hidrosoluble está controlada por *FUT2* (alelo dominante *Se*). En una población caucásica, alrededor del 80% son secretores (genotipo *SeSe o Sese*) y el 20% son no secretores (genotipo *sese*) (tabla 19.6). Los secretores tienen sustancia H en la saliva y otros fluidos corporales junto con sustancias A, B o ambas, dependiendo de su grupo sanguíneo. En las secreciones de los no secretores sólo existen trazas de estas sustancias, aunque los antígenos se expresan normalmente en sus eritrocitos y otros tejidos.

El estatus individual de secretor puede ser determinado por análisis de la sustancia ABH en la saliva (v. pág. 434).

Tabla 19.6. Estado secretor en la población caucásica

Genes	Grupo sanguíneo de los eritrocitos	Sustancia ABH presente en la saliva	Incidencia (%)
Secretor			
SeSe	A	A + H o B	B + H
Sese	AB	A + B + H	80
		O	H
No-secretores			
sese	A, B, AB o O	Ninguna	20

Antígenos ABO y enfermedad

Los individuos del grupo A pueden adquirir en raras ocasiones un antígeno B de una infección bacteriana que produce la liberación de una enzima desacetilasa. Ésta convierte la N-acetil-D-galactosamina en α-galactosamina, que es similar a la galactosa, el azúcar inmunodominante del grupo B, lo que causa, algunas veces, que los eritrocitos parezcan del grupo AB. En los casos de que se informó originalmente, cinco de los siete pacientes tenían un carcinoma del tracto gastrointestinal. Los informes de casos atestiguan sobre el peligro de transfundir con eritrocitos AB a individuos con un antígeno B adquirido, lo que resulta en una reacción transfusional hemolítica fatal, debida a la producción de anti-B hiperinmune[8].

Se sabe también que la herencia de antígenos ABH se asocia débilmente con la predisposición a ciertas enfermedades. Los individuos del grupo A tienen 1,2 veces más riesgo de desarrollar carcinoma gástrico que los del grupo O o B; los individuos del grupo O tienen 1,4 veces más riesgo de desarrollar úlcera péptica que los individuos que no son del grupo O; y los no secretores de ABH tienen 1,5 veces más riesgo de desarrollar úlcera péptica que los secretores[9]. El grupo ABO también afecta al factor plasmático de Von Willebrand (FVW) y a los niveles de factor VIII; los individuos sanos del grupo O tienen niveles alrededor de un 25% menores que los otros grupos ABO[10]. Se ha demostrado que la expresión del antígeno H (que es mayor en los individuos del grupo O) es la que media este efecto, y podría ser debido a aclaramiento acelerado del FVW a través de un mecanismo mediado por fucosa[11]. También en las personas con leucemia, con frecuencia, los antígenos ABO se expresan más débilmente en los eritrocitos.

Anticuerpos ABO

Anti-A y anti-B

Los anticuerpos ABO, en ausencia de los correspondientes antígenos, aparecen durante los primeros meses tras el nacimiento, probablemente como resultado de exposición a sustancias similares a los antígenos ABH en la dieta o en el ambiente (es decir, «ocurren naturalmente») (v. tabla 19.4). Esto permite la determinación indirecta del grupo (suero/plasma) como un medio de confirmar el fenotipo de los eritrocitos. Los anticuerpos son una causa potencial de reacción transfusional hemolítica peligrosa, si se administran transfusiones sin considerar la compatibilidad ABO. Los anti-A y anti-B son casi siempre inmunoglobulinas M (IgM). Aunque éstas reaccionan mejor a baja temperatura, sin embargo, son potencialmente líticas a 37 °C. Los anti-A y anti-B hiperinmunes ocurren con menor frecuencia, generalmente como respuesta a una transfusión o a un embarazo, pero podrían también formarse tras inyección de algunos toxoides o vacunas. Estos anticuerpos son predominantemente de clase IgG y son generalmente producidos por el grupo O y a veces por individuos del grupo A_2. La IgG hiperinmune anti-A y/o anti-B de las madres con grupo O o A_2 pueden cruzar la placenta y causar enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN). Estos anticuerpos reaccionan con un amplio intervalo de temperaturas y producen hemólisis más eficazmente que los anticuerpos naturales. Los donantes del grupo O deberían también ser evaluados por si presentan anticuerpos hiperinmunes anti-A y anti-B, que pueden causar hemólisis cuando se transfundan plaquetas del grupo O o sangre completa a receptores con fenotipos A y B.

Los hemoderivados que contengan plasma de donante universal peligroso (título elevado) deben reservarse para receptores de grupo O.

Anti-A_1 y anti-H

Los anti-A_1 reaccionan sólo con células A_1 y A_1B y se encuentran ocasionalmente en el suero de individuos del grupo A_2 (1-8%) y no infrecuentemente en el suero de sujetos A_2B (25-50%). Sin embargo, los anti-A_1 normalmente actúan como una aglutinina fría y muy raramente son reactivos a 37 °C, siendo sólo capaces de una limitada destrucción de los eritrocitos. Existen pocos informes de hemólisis de eritrocitos atribuida a anti-A_1, que algunos autores han cuestionado, porque aunque los anticuerpos reaccionaban sólo con eritrocitos A_1, no se intentó absorberlos con células A_2, lo que habría revelado su especificidad anti-A.

Los anti-H reaccionan con más fuerza con los eritrocitos del grupo O y A_2 y normalmente actúan también como aglutininas frías. Una notable, pero rara excepción, es el anti-H que se produce en el fenotipo Oh Bombay, que es un anticuerpo IgM que causa lisis a 37 °C (v. tabla 19.4), por lo que para ser transfundido requeriría sangre con fenotipo Oh Bombay.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Sistema Lewis

Antígenos Lewis y genes codificadores

Los antígenos Lewis (Le^a y Le^b) se localizan en los glucoesfingolípidos solubles presentes en la saliva y el plasma y son secundariamente absorbidos al interior de la membrana del glóbulo rojo desde el plasma.

El gen Le en el locus *FUT3 (LE)* está localizado en el cromosoma 19 y codifica para una fucosiltransferasa, que actúa sobre una molécula de azúcar adyacente para que actúe mediante el gen *Se*. Cuando *Se* y *Le* están presentes, se produce el antígeno Le^b; cuando está presente *Le*, pero no *Se*, se produce Le^a; y cuando no está presente *Le*, no se producen ni Le^a ni Le^b. Después de una transfusión de eritrocitos, los eritrocitos del donante se convertirán al tipo Lewis del receptor a causa del continuo intercambio de glucoesfingolípidos entre el plasma y la membrana de los eritrocitos.

Los neonatos tienen el fenotipo Le (a–b–), porque en los primeros 2 meses de vida se producen bajos niveles de fucosiltransferasa.

Anticuerpos Lewis

Los anticuerpos Lewis se producen de forma natural; normalmente son IgM y fijan el complemento. *In vitro*, su reactividad se potencia por el uso de eritrocitos tratados con enzimas, pudiendo producir lisis. Sin embargo, sólo excepcionales ejemplos de anti-Le^a, estrictamente reactivos a 37 °C, producen reacciones transfusionales hemolíticas y no existen claras evidencias de que los anti-Le^b hayan causado alguna vez un episodio hemolítico. Las explicaciones para la relativa ausencia de significado clínico incluyen su amplitud térmica, la neutralización por los antígenos Lewis en el plasma de la sangre transfundida y la gradual elución de los antígenos Lewis por los eritrocitos del donante. Por tanto, es aceptable suministrar eritrocitos para transfusiones, que no hayan sido tipados como negativos para el antígeno Lewis relevante, pero que son compatibles con el plasma del receptor cuando se realizan las pruebas de compatibilidad estrictamente a 37 °C.

No se han observado casos en los que los anticuerpos Lewis hayan provocado enfermedades hemolíticas del feto o recién nacido. La influencia del grupo Lewis en el resultado del trasplante renal es incierta.

Sistema P y colección de globósidos

Antígenos

El antígeno P_1 del sistema P y los antígenos P y P^k de la colección de globósidos están relacionados. Se conoce poco sobre los genes implicados o sus productos, pero todos derivan del precursor lactosil ceramida. Los carbohidratos relacionados con el sistema P están ampliamente distribuidos en la naturaleza.

La expresión de P_1 varía considerablemente entre individuos. Uno de cada 100.000 individuos es p (negativo para P) y es resistente a infección por parvovirus B19.

Anticuerpos

Los anti-P_1 son unos anticuerpos frecuentes producidos de forma natural y sin significado clínico, y se puede suministrar eritrocitos para transfusiones con pruebas cruzadas compatibles a 37 °C. El alo anti-P es también un anticuerpo producido de forma natural encontrado en individuos con el raro fenotipo P^k. El autoanti-P es la especificidad atribuida al anticuerpo de Donath–Landsteiner, que es una potente hemolisina bifásica, responsable de hemoglobinuria paroxística *a frigore*.

El anti-PP_1 P^k es un anticuerpo adquirido de forma natural, a títulos altos, IgM o IgG; se encuentra sólo en individuos con el raro fenotipo p. Es reactivo a 37 °C y es capaz de producir hemólisis intravascular y EHRN. Se asocia también con abortos espontáneos en las primeras fases del embarazo.

Sistema Rh

El sistema Rh, inicialmente conocido como el sistema Rhesus, fue así llamado por el anticuerpo original que fue obtenido por la inyección de eritrocitos de monos rhesus a conejos y cobayas, que reaccionaba con la mayoría de los eritrocitos humanos. Aunque posteriormente se demostró que el anticuerpo original (ahora llamado anti-LW) era diferente del anti-D, la terminología Rh ha sido mantenida para el sistema humano de grupos sanguíneos. La importancia clínica de este sistema reside en que los individuos que son D negativos sufren frecuentemente el estímulo para producir anti-D si se transfunden con sangre D positiva, o en el caso de la mujer embarazada, si está expuesta a eritrocitos fetales D positivos que cruzan la placenta.

Antígenos Rh y genes codificadores

Éste es un sistema muy complejo. Para simplificarlo, es conveniente clasificar a los individuos como D positivos o D negativos, dependiendo de la presencia del antígeno D. En gran parte se trata de una medida preventiva, para evitar transfundir a receptores D negativos con células que expresen el antígeno D, que es el antígeno eritrocitario más inmunogénico después del A y el B. A un nivel más exhaustivo, es conveniente considerar el sistema Rh como un complejo de genes que ocasiona varias combinaciones de tres antígenos alternativos (C o c, D o d, y E o e) como originalmente sugirió Fisher. Se pensó que el gen d era amórfico y sin ningún antígeno correspondiente en el hematíe. Más recientemente, se ha confirmado que el locus *RH* está en el cromosoma 1 y comprende dos genes altamente homólogos muy estrechamente ligados, *RHD* y *RHCE*, cada uno con 10 exones. Cada gen codifica para una proteína transmembrana diferente con 417 residuos y 12 dominios transmembrana putativos. Las proteínas D y CE difieren en 35 residuos. El gen *RHCE* tiene cuatro alelos principales: *CE, Ce, ce* y *cE*. Las posiciones 103 y 226 en el polipéptido CE, situadas en el bucle externo, determinan respectivamente el polimorfismo C/c (serina/prolina) y E/e (prolina/alanina). Este concepto de los genes D y CcEe ligados estrechamente y transmitidos como un conjunto es compatible con la nomenclatura de Fisher.

En los individuos D negativos caucásicos, el gen *RHD* está suprimido, mientras que en la raza negra y otras poblaciones se han descrito mutaciones en un único punto, deleciones parciales o recombinaciones. En individuos con un antígeno D débil (D^u), existe una reducción cuantitativa en los *loci* del antígeno D, que se cree es debida a un defecto transcripcional no caracterizado. Estos individuos no forman anticuerpos anti-D tras un contacto con el antígeno D. Los individuos D parciales carecen de uno o más epítopos del antígeno D, definido usando paneles de reactivos monoclonales. El D^{VI} es quizás el más importante fenotipo D parcial porque estos individuos, con cierta frecuencia, forman anti-D. Los fenotipos D parciales surgen de intercambios del ADN entre los genes *RHD* y *RHCE* y de otras reorganizaciones. Cartron y Agre[12], Huang[13] y Avent y Reid[14] han realizado extensas revisiones de este sistema.

Los haplotipos Rh se identifican, bien por sus componentes antigénicos (p. ej., CDe, cde) o bien por un único símbolo abreviado (p. ej., R^1 = CDe, r = cde). Así, una persona puede heredar *CDe* (R^1) de un progenitor y *cde* (r) del otro y tener el genotipo *CDe/cde* (R^1r). Los haplotipos en orden de frecuencia y sus correspondientes abreviaturas se enumeran en la tabla 19.7. Aunque se usan otras dos nomenclaturas para describir el sistema Rh, llamadas terminología Rh de Wiener y notación numérica de Rosenfield, la nomenclatura CDE, derivada de la teoría original de Fisher, es la recomendada por el World Health Organization Expert Committee[15] en interés de la simplicidad y la uniformidad. Los antígenos Rh se definen por el correspondiente antisuero, con la excepción del «anti-d», que no existe. Consecuentemente, la distinción entre homocigoto DD y heterocigoto Dd no puede hacerse por pruebas serológicas directas, aunque podría determinarse por estudios familiares informativos. Es todavía una práctica rutinaria predecir el genotipo a partir del fenotipo, basándose en tablas de probabilidad para los distintos genotipos Rh de la población (v. tabla 20.3, pág. 457). Sin embargo, en mujeres con anti-D e historia de afección de un niño por EHRN, se emplea la secuenciación del ADN del *RH*, como prueba fetal para el estatus D, para decidir el manejo clínico del embarazo. La secuenciación del ADN requiere menos tejido fetal y puede realizarse más precozmente en el embarazo, antes de que las proteínas Rh se expresen en los eritrocitos. Las fuentes disponibles incluyen el líquido amniótico (amniocitos) y las células trofoblásticas (vellosidades coriónicas) y también se ha establecido que puede emplearse sangre materna si contiene ADN fetal[16,115]. En la práctica, se emplea una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple, con más de dos equipos cebadores, para detectar las diferentes bases moleculares para los fenotipos D negativos en personas no caucásicas. La secuenciación del ADN del *RH* tiene también aplicaciones en las pruebas de paternidad y en medicina forense. Hay diferencias raciales en la distribución de los antígenos Rh; por ejemplo, la negatividad del D es más frecuente en caucásicos (aproximadamente el 15%), mientras que el R^0(cDe) se encuentra en aproximadamente el 48% de los negros americanos, pero es infrecuente (aproximadamente el 2%) en los caucásicos.

Tabla 19.7. Haplotipos Rh en orden de frecuencia (nomenclatura de Fisher) en caucásicos y nombre breve

Fisher	Notaciones breves	Frecuencia aproximada (%)
CDe	R^1	41
cde	r	39
cDE	R^2	14
cDe	R^0	3
C^wDe	R^{1w}	1
cdE	r''	1
Cde	r'	1
CDE	R^Z	Infrecuente
CdE	r^y	Infrecuente

Los antígenos Rh se encuentran sólo en los eritrocitos y son una parte estructural de la membrana celular. La completa ausencia de antígenos Rh (fenotipo Rh nulo) puede asociarse con una anemia hemolítica congénita con esferocitos y estomatocitos en el frotis sanguíneo, incremento de la fragilidad osmótica e incremento del transporte de cationes. Este fenotipo surge como resultado de homocigosidad para un alelo silente en el locus *RH* (el tipo amorfo) o, más frecuentemente, por homocigosidad para un gen autosómico supresor (X^0r), genéticamente independiente del locus *RH* (el tipo regulador). Los antígenos Rh están bien desarrollados antes del nacimiento y pueden ser demostrados en los eritrocitos de los fetos en etapas muy tempranas.

Anticuerpos

La nomenclatura de Fisher es adecuada cuando se aplica a los anticuerpos Rh, y se han descrito anticuerpos dirigidos contra todos los antígenos Rh, excepto el d: anti-D, anti-C, anti-c, anti-E y anti-e. Los antígenos Rh están restringidos a los eritrocitos y los anticuerpos Rh resultan de aloinmunizaciones previas por embarazo o transfusión, excepto para algunas formas de anti-E y anti-C^W, adquiridas de forma natural. Los anticuerpos Rh inmunes son predominantemente IgG (IgG1 y/o IgG3), pero pueden tener un componente IgM. Reaccionan óptimamente a 37 °C, no fijan el complemento y su detección es a veces potenciada por el uso de eritrocitos tratados con enzimas. Por tanto, cuando ocurre hemólisis, ésta es extravascular y predominantemente en el bazo.

El anti-D es el anticuerpo más importante clínicamente; puede causar reacciones transfusionales hemolíticas y era una causa frecuente de muerte fetal debida a enfermedad hemolítica del recién nacido antes de la introducción de la profilaxis anti-D. El anti-D se acompaña de anti-C en el 30% de los casos y de anti-E en el 2%. La inmunización primaria que sigue a una transfusión de células D positivas

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

se hace aparente en 2-5 meses, pero puede no ser detectable tras exposición a pequeñas dosis de células D positivas en el embarazo. Sin embargo, una segunda exposición a células RhD positivas en un embarazo posterior provocará una rápida respuesta inmune de células con memoria o secundaria.

De los anticuerpos Rh no D, el anti-c es el más frecuentemente encontrado y puede también provocar una grave enfermedad hemolítica del feto o del recién nacido. El anti-E es menos frecuente, mientras que anti-C es raro en ausencia de anti-D.

Sistemas Kell y Kx

Antígenos y genes codificadores

Se han identificado veinticinco antígenos (K1–K25), pero sólo son clínicamente importantes tres juegos de alelos muy estrechamente ligados: *K* (KEL1) y *k* (KEL2); Kp^a (KEL3), Kp^b (KEL4) y Kp^c (KEL21); y Js^a (KEL6) y Js^b (KEL7). Estos antígenos son codificados por alelos en el locus *KEL* del cromosoma 7, pero su producción también depende de genes en el locus *KX* del cromosoma X. El antígeno K está presente en el 9% de la población inglesa. El antígeno Kp^b tiene una elevada frecuencia en caucásicos; el antígeno Js^b es universal en caucásicos y casi universal en la raza negra.

La proteína Kell es una glucoproteína de un solo dominio transmembrana y se cree que forma un complejo con un puente disulfuro con la proteína Kx, que tiene múltiples dominios transmembrana con 10 dominios transmembrana putativos. Tiene una considerable homología en las secuencias con otras endopeptidasas neutras.

En el fenotipo de McLeod, los eritrocitos carecen de Kx y hay un marcado descenso de antígenos Kell, una morfología acantocítica y una anemia hemolítica compensada. El síndrome de McLeod está ligado al cromosoma X con lenta progresión a miocardiopatía, debilidad del músculo esquelético y defectos neurológicos.

Anticuerpos Kell

El anti-K inmune es el anticuerpo que se detecta con mayor frecuencia después de los de los sistemas ABO y Rh. Generalmente es IgG1 y ocasionalmente se une al complemento. Otros anticuerpos inmunes dirigidos contra los antígenos Kell son menos frecuentes. La presencia de algunos de estos anticuerpos, tales como anti-k, anti-Kp^b y anti-Js^b, pueden causar importantes dificultades en la selección de unidades antígeno negativas para una transfusión.

Sistema Duffy

Antígenos Duffy y genes codificadores

El locus Duffy (Fy) está en el cromosoma 1 y codifica para una proteína de múltiples dominios transmembrana con siete o nueve dominios putativos.

El locus tiene los siguientes alelos: Fy^a, Fy^b, que codifican para los antígenos codominantes Fy^a y Fy^b, respectivamente; Fy^x, que es responsable de un antígeno débil Fy^b, y *Fy*, que es responsable cuando es homocigoto del fenotipo Fy(a–b–) en la raza negra. Este gen *Fy* es idéntico al gen Fy^b en su región estructural pero tiene una mutación en la región promotora, que condiciona la ausencia de producción de la glucoproteína Duffy de los eritrocitos.

La glucoproteína Fy (también conocida como antígeno Duffy receptor para quimiocinas, ADRQ) es un receptor para las clases CC y CXC de quimiocinas proinflamatorias y se expresa en las células endoteliales vasculares y en las células de Purkinje en el cerebelo, pero su papel preciso como potencial recogedor del exceso de quimiocinas es desconocido. La glucoproteína Fy es también un receptor para *Plasmodium vivax*.

Anticuerpos Duffy

El anti-Fy^a es mucho más frecuente que el anti-Fy^b, y el resto de los anticuerpos Duffy son raros. Son predominantemente IgG1 y a veces fijan complemento.

Sistema Kidd (JK)

Antígenos Kidd y genes codificadores

Los genes del locus *HUT11 (JK)* en el cromosoma 18 codifican para una proteína de múltiples dominios transmembrana, que transporta tanto los antígenos Kidd como el transportador de urea eritroide humano. Los alelos codominantes Jk^a y Jk^b producen un polimorfismo en *HUT11*, que difiere por la sustitución de un único aminoácido en la posición 280 (Asp/Asn).

El fenotipo Jk(a–b–) es muy raro y está causado por herencia homocigota del alelo silente *Jk* en el locus *JK* o por herencia del gen dominante inhibidor *In (Jk)* no ligado al locus *JK*. Estas células Jk(a–b–) son resistentes a la lisis por soluciones de urea y tienen un defecto selectivo en el transporte de urea.

Anticuerpos Kidd

El anti-Jk^a es más frecuente que el anti-Jk^b; ambos suelen ser IgG. Los anticuerpos Kidd normalmente fijan complemento, lo que se cree debido a que la mayoría de ellos contienen una fracción IgG3. El anti-Jk3 es producido por los individuos del fenotipo Jk(a–b–).

Los anticuerpos Kidd pueden ser difíciles de detectar, porque a veces aparecen dosificados (pueden sólo reaccionar con células con expresión homocigota de Jk^a y Jk^b), disminuyen a niveles indetectables en plasma y están a menudo presentes en mezclas de aloanticuerpos.

Sistema MNSs

Antígenos MNSs y genes codificantes

El *GYPA* y el *GYPB* son genes estrechamente ligados situados en el cromosoma 4, que codifican para la glucoforina A (GPA) y la glucoforina B (GPB), respectivamente. Tanto GPA como GPB son sialoglucoproteínas con un solo dominio transmembrana. El *M* y el *N* son alelos del *GYPA* (que codifican los antígenos M y N en GPA), y *S* y *s* son alelos de *GPYB* (que codifican los antígenos S y s en GPB). Se

han descrito muchas variantes raras debidas a deleción de genes, mutaciones e intercambios de segmentos.

El antígeno U se encuentra en los eritrocitos de los caucásicos y en el 99% de la raza negra. Los individuos U-negativos son, salvo raras excepciones, S–s– y carecen o tienen una forma anómala de GPB.

Anticuerpos MNSs

El anti-M es un anticuerpo relativamente común que puede ser IgM o IgG. En raros casos son reactivos a 37 °C, que es cuando pueden producir una reacción transfusional hemolítica. El anti-M muy rara vez provoca una EHRN.

El anti-N es infrecuente y no tiene significado clínico.

Los anti-S y anti-s son normalmente IgG; en raras ocasiones se ha descrito su implicación en reacciones transfusionales hemolíticas y EHRN.

El anti-U es un raro anticuerpo inmune, que generalmente contiene un componente IgG1. Se sabe que causa reacciones transfusionales hemolíticas fatales y EHRN grave.

Otros sistemas de grupos sanguíneos

Sistema Lutheran

Los antígenos del sistema Lutheran no están bien desarrollados en el momento del nacimiento, y como consecuencia de ello no hay casos documentados de enfermedad hemolítica clínicamente significativa debida a anticuerpos Lutheran.

El Anti-Lu^a es infrecuente y rara vez tiene significado clínico. El anti-Lu^b ha causado hemólisis extravascular.

Sistema Yt (Cartwright)

Los antígenos Yt^a e Yt^b se encuentran en la acetilcolinesterasa ligada a GPI. Algunos ejemplos de anti-Yt^a han causado destrucción acelerada de eritrocitos.

Sistema Colton

Los antígenos del sistema Colton (Co^a y Co^b) son transportados por la proteína transportadora de agua, proteína integral formadora de canal (CHIP-1). El Anti-Co^a y el menos frecuente anti-Co^b son a veces clínicamente significativos.

Sistema Dombrock

Los antígenos del sistema Dombrock son Do^a y Do^b, así como los antígenos de elevada incidencia Gy^a, Hy y Jo^a. Los anticuerpos de este sistema son generalmente débiles, pero todos deberían ser considerados potencialmente significativos.

Significado clínico de los aloanticuerpos de los eritrocitos

En la tabla 19.8 se describe la importancia de los aloanticuerpos descritos con respecto a la naturaleza de la reacción transfusional hemolítica que producen. Sin embargo, la mayoría de las reacciones transfusionales son el resultado de una incompatibilidad ABO[17], como se muestra en la tabla 19.9.

Tabla 19.8. Especificidades de los anticuerpos relacionados con el mecanismo de destrucción inmune

Sistema grupo sanguíneo	Hemólisis intravascular	Hemólisis extravascular
ABO,H	A, B, H	
Rh		All
Kell	K	K, k, Kp^a, Kp^b, Js^a, Js^b
Kidd	Jk^a	Jk^a, Jk^b, Jk^3
Duffy		Fy^a, Fy^b
MNS		M, S, s, U
Lutheran		Lu^b
Lewis	Le^a	
Cartwright		Yt^a
Colton		Co^a, Co^b
Dombrock		Do^a, Do^b

Tabla 19.9. Reacciones transfusionales hemolíticas agudas fatales comunicadas a la FDA en los Estados Unidos entre 1976 y 1985

Incompatibilidad	N.º de muertes
Receptor O y eritrocitos A	80
Receptor O y eritrocitos B/AB	26
Receptor B y eritrocitos A/AB	12
Receptor A y eritrocitos B	6
Plasma O a receptor A/AB	6
Plasma B a receptor AB	1
Total de incompatibilidades ABO	**131**
Anti-K	5
Anti-E+K+P_1	1
Anti-Jk^b	1
Anti-Jk^a+Jk^b+Jk^3	1
Anti-Fy^a	1
Total de incompatibilidades no ABO	**9**

Mollison y cols.[18] analizaron la importancia de los antígenos del grupo sanguíneo diferentes del sistema ABO y D, examinando la prevalencia de aloanticuerpos de eritrocitos inducidos por transfusión, excluyendo los anti-D, -CD y -DE (tabla 19.10). Los anticuerpos Rh, principalmente anti-c o anti-E, constituyen el 53% del total y los anti-K y anti-Fy^a un 38% adicional, dejando sólo un 9% para el resto de las especificidades. En un grupo menor de pacientes que experimentaron reacciones transfusionales hemolíticas (RTH) inmediatas, se encontró una distribución similar de los

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 19.10. Frecuencia relativa de anticuerpos antieritrocitarios aloinmunes[a]

		Aloanticuerpos de grupo sanguíneo (% del total)				
Grupo de los pacientes	N.° estudiado	Rh[b]	K	Fy	Jk	Otros
Transfundidos (algunos embarazos)	5.228	53,1	28,1	10,2	4,0	4,7
RTH inmediata[c]	142	42,2	30,3	18,3	8,5	0,7
RTH retardada[c]	82	34,2	14,6	15,9	32,9	2,4

[a] Excluyendo anticuerpos ABO, Lewis, sistema P y anti-M y anti-N.
[b] Excluyendo anti-D (o -CD o -DE); casi todos fueron anti-c o anti-E.
[c] Reacción transfusional hemolítica.
Modificado de Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M, 1997. Blood transfusion in clinical medicine, 9th ed. Blackwell Scientific, Oxford, pág. 112, basada en datos publicados de varias fuentes.

diferentes anticuerpos antieritrocitos. Sin embargo, las estadísticas para las RTH retardadas muestran un llamativo incremento en la frecuencia relativa de los anticuerpos Jk, lo que refleja las características resumidas de los anticuerpos Jk.

La enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido no se ha asociado con anticuerpos dirigidos contra los antígenos Lewis, y sólo se produce una enfermedad muy leve con anti-Lu^a y anti-Lu^b. Con estas excepciones, el resto de los anticuerpos IgG dirigidos contra antígenos de los sistemas mencionados deberían considerarse capaces de causar hemólisis en esta situación.

El significado de los muchos otros antígenos de los eritrocitos no referidos en el texto se resume en la tabla 19.11. Sin embargo, debería resaltarse que los anticuerpos enumerados suelen ser completa o predominantemente IgG y deberían ser detectables en las pruebas pretransfusionales rutinarias usando la prueba de antiglobulina indirecta (PAI).

Es difícil encontrar sangre adecuada para transfundir a un paciente cuyo suero contiene anticuerpos, como los anti-Vel, que tienen una especificidad para un antígeno de alta frecuencia y que puede causar una reacción transfusional hemolítica grave. Además del empleo de una unidad de sangre congelada, debería considerarse la sangre autóloga y, si es necesario, debería investigarse la compatibilidad de los hematíes de familiares cercanos (particularmente hermanos). Los anticuerpos como los anti-Kn^a se encuentran con frecuencia; no son clínicamente importantes, aunque su presencia puede retrasar el suministro de la sangre hasta que se haya determinado su especificidad.

Mecanismos de destrucción inmune de los eritrocitos

La hemólisis de los eritrocitos mediada por inmunidad depende de lo siguiente[19]:

1. La clase de inmunoglobulina del anticuerpo (a efectos prácticos, los anticuerpos dirigidos contra los antígenos de los eritrocitos son IgM, IgG o ambas).
2. La capacidad del anticuerpo de unirse al complemento.
3. La interacción con el sistema reticuloendotelial (sistema mononuclear fagocítico). El fagocito más importante que participa en la hemólisis inmune es el macrófago, predominantemente en el bazo. El mecanismo de la hemólisis inmune también determina el lugar de la hemólisis:

a) Hemólisis intravascular. Es debida a la unión secuencial de componentes de la cascada del complemento (C1 a C9) y a la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC; C5b678[9]$_n$). Esto es característico de los anticuerpos IgM, pero algunos anticuerpos IgG pueden también actuar como hemolisinas. En las reacciones transfusionales con incompatibilidad ABO, los eritrocitos en general se destruyen por lisis intravascular debida al complemento (v. pág. 471). La mayor parte de la destrucción aloinmune restante de los eritrocitos es extravascular y está mediada por el sistema mononuclear fagocítico.

Los autoanticuerpos de los eritrocitos pueden también causar lisis intravascular, sobre todo los autoanticuerpos IgG de la HPF (v. pág. 219) y algunos autoanticuerpos de la enfermedad por hemoaglutininas frías (CHAD) (v. pág. 218). La lisis intravascular mediada por complemento también puede producirse en la hemólisis inmune mediada por fármacos (v. pág. 221).

b) Hemólisis extravascular. Está mediada por el sistema mononuclear fagocítico, es característica de los anticuerpos IgG y se produce principalmente en el bazo. Está causada por anticuerpos IgG no ligados a complemento o por aquellos que ligan cantidades sublíticas de complemento. Los macrófagos tienen receptores Fcγ para la unión de la IgG a la célula, y los eritrocitos sensibilizados pueden ser completamente fagocitados o perder parte de su membrana y retornar a la circulación como microesferocitos. Los esferocitos son menos deformables y quedan más fácilmente atrapados en el bazo que los eritrocitos normales, lo que acorta su período de vida. Además de la fagocitosis mediada por el receptor Fc, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) puede también contribuir al daño celular durante el contacto cercano con los macrófagos esplénicos. Los

Tabla 19.11. Antígenos de grupos sanguíneos menores

Antígeno	Frecuencia del antígeno en caucásicos (%)	RTH asociadas	EHRN asociada	Comentarios
Di^a Di^b	0 100	Sí Sí	Sí Sí	Parte del sistema DI. Di^a Más frecuente en indios americanos y orientales
Wr^a	<0,1	Sí	Sí	
Xg^a	65 (hombres) 88 (mujeres)	Raras veces	Raras veces	Xg^a único antígeno en el sistema
Sc1 Sc2	>99,9 <0,1	No No	No Leve	3 antígenos en el sistema SC
Ge2 Ge3	100 >99,9	Algunas Algunas	No No	7 antígenos en el sistema GE
Cr^a	100	Algunas	No	10 antígenos en el sistema CR
Ch1 Rg1	96 98	No No	No No	9 antígenos en los sistemas CH/RG, radica en C4
Kn^a McC^a Yk^a	98 98 92	No No No	No No No	Pertenece al sistema KN de 5 antígenos
In^a In^b	0,1 99	Sí Sí	No No	In^a tiene una incidencia del 4% en indios asiáticos
LW^a	100	Algunas	Leve	—
JMH	>99,9	No	No	Una de las 901 series de antígenos de elevada incidencia
Vel	>99,9	Sí	No	Una de las 901 series; unión al complemento
Bg^a	Aprox. 15	No	No	Corresponden a HLA-B7, detectable en los eritrocitos

EHRN: enfermedad hemolítica del recién nacido; RTH: reacción transfusional hemolítica.

eritrocitos son destruidos fuera de la membrana del monocito por enzimas lisosomales secretadas por esta célula[20].

Los *componentes del complemento* pueden favorecer la destrucción de los eritrocitos. La activación del complemento por algunos anticuerpos IgM y la mayoría de los IgG no es siempre completa y los eritrocitos escapan de la lisis intravascular. La activación del complemento se detiene en la fase C3 y, en estas circunstancias, puede detectarse complemento en los eritrocitos por la prueba de antiglobulina usando reactivos anticomplemento apropiados. El primer producto de activación de C3 es el C3b ligado a la membrana, que de forma constante es degradado a C3bi. Los eritrocitos con estos componentes en su superficie se adhieren a fagocitos (monocitos, macrófagos y granulocitos), que tienen receptores de complemento CR1 (CD35) y CR3 (CD11b/CD18). Estas células sensibilizadas son rápidamente secuestradas en el hígado por su elevada masa de células fagocíticas (Küpffer) y su gran flujo sanguíneo, pero no se produce destrucción de las mismas. Cuando se escinde C3bi, dejando sólo C3dg en la superficie celular, las células marcadas con C3dg «inactivo» regresan a la circulación, como en la enfermedad crónica por hemaglutininas. Sin embargo, cuando también hay IgG en la superficie celular, C3b favorece la fagocitosis, y en estas circunstancias tanto el hígado como el bazo son lugares importantes de hemólisis extravascular. De este modo, C3b y C3bi aumentan el aclaramiento mediado por macrófagos de células recubiertas de IgG, y los anticuerpos ligados a cantidades sublíticas de complemento (p. ej., anticuerpos Duffy y Kidd) pueden causar una destrucción más rápida y síntomas más marcados que los anticuerpos que no fijan complemento (p. ej., anticuerpos Rh).

La actividad de los macrófagos es un importante componente de la destrucción celular, y estudios adicionales de las interacciones celulares en esta fase de la hemólisis inmune podrían aportar una explicación para las diferentes intensidades de la hemólisis en pacientes con anticuerpos aparentemente iguales. Para valorar este aspecto de la he-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

mólisis inmune se han introducido análisis *in vitro* con macrófagos (monocitos) que complementan las técnicas serológicas convencionales[21].

Entre los factores que pueden afectar la interacción entre células sensibilizadas y macrófagos se incluyen los siguientes:

1. *Subclase de IgG*. Los anticuerpos IgG1 e IgG3 tienen una mayor afinidad de unión a los receptores mononucleares Fcγ que los anticuerpos IgG2 e IgG4.
2. *Densidad del antígeno*. Número de moléculas de anticuerpo unidas a la superficie celular.
3. *IgG en fase fluida*. La concentración en suero de IgG es un determinante de la función mononuclear-fagocítica dependiente de Fc. Niveles normales de IgG bloquean la adherencia *in vitro* de los eritrocitos sensibilizados a los receptores Fc de los monocitos (particularmente FcγR1). La hemoconcentración en los sinusoides esplénicos es probablemente un factor importante para minimizar este efecto *in vivo*, lo que puede explicar por qué el bazo es unas 100 veces más eficaz que el hígado para eliminar las células sensibilizadas por IgG, a pesar de la mayor masa de macrófagos y mayor flujo sanguíneo hepáticos. El efecto inicial de IgG i.v. a alta dosis es causar un bloqueo del receptor FcγR del macrófago. Esto reduce el aclaramiento inmune de células recubiertas de anticuerpos y tiene una particular aplicación en el manejo de la trombocitopenia autoinmune y la púrpura postransfusional.
4. *Regulación de la actividad de los macrófagos*. Actualmente se sabe que las citocinas son importantes en la estimulación de los receptores de macrófagos. El interferón gamma favorece la actividad fagocítica de los macrófagos por aumento de la expresión de FcγRI *in vitro* e *in vivo*, y también activa FcγII sin incrementar el número de estos receptores[22].

La interleucina-6 también favorece la activación del FcγRII e incrementa la actividad del receptor CR1, que ocurre a través de la acción de las citocinas de las células T y a través de agentes quimiotácticos liberados en la respuesta inflamatoria[23]. En pacientes con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica se han monitorizado los niveles incrementados de citocinas proinflamatorias y otros mediadores biológicos y sus efectos sobre la actividad del sistema fagocítico monocítico[24]. Es por tanto posible que la liberación de citocinas durante las infecciones víricas y bacterianas pudiera, al menos en parte, desencadenar algún episodio de destrucción celular autoinmune.

La tasa de destrucción inmune está, por tanto, determinada por las características del antígeno y el anticuerpo y el nivel de activación del sistema fagocítico monocítico.

Reacciones antígeno-anticuerpo

El glóbulo rojo es un marcador práctico de las reacciones serológicas. La aglutinación o lisis (debida a la acción del complemento) es un indicador visible (variable de valoración) de la reacción antígeno-anticuerpo. La reacción ocurre en dos fases: en la primera el anticuerpo se une al antígeno del glóbulo rojo (sensibilización); la segunda implica la aglutinación (o lisis) de las células sensibilizadas.

La *primera fase* (es decir, asociación del anticuerpo con el antígeno [sensibilización]) es reversible y la fuerza de unión (constante de equilibrio) depende de la «exactitud de encaje» entre el antígeno y el anticuerpo. Esto se ve influido por los siguientes factores:

1. *Temperatura*. Los anticuerpos fríos (usualmente IgM) suelen fijarse mejor al hematíe a baja temperatura (p. ej., 4 °C), mientras que los anticuerpos calientes (usualmente IgG) se fijan más eficazmente a temperatura corporal (es decir, 37 °C).
2. *pH*. En un intervalo de pH de 5,5-8,5, hay relativamente poco cambio en la unión de los anticuerpos, pero para asegurar resultados comparables es preferible tamponar la solución salina en que se diluye el suero o las células para fijar el pH, generalmente a 7,0. Algunas técnicas de elución de anticuerpos se basan en la alteración del pH a menos de 4 o más de 10.
3. *Fuerza iónica del medio*. Una baja fuerza iónica incrementa la tasa de unión de los anticuerpos. Ésta es la base de las pruebas de detección de anticuerpos que emplean solución salina de baja fuerza iónica (LISS).

La *segunda fase* se basa en varias manipulaciones de laboratorio para promover la aglutinación o lisis de las células sensibilizadas. La superficie celular está cargada negativamente (principalmente debido a residuos de ácido siálico), lo que mantiene separadas las células individuales; la distancia mínima entre eritrocitos suspendidos en solución salina es de alrededor de 18 nm. La aglutinación se debe al entrecruzamiento que los anticuerpos facilitan entre las células. El espacio entre los lugares de unión al antígeno en las moléculas de IgM (30 nm) es suficiente para permitir a los anticuerpos IgM formar un puente entre los eritrocitos suspendidos en solución salina (después de asentarse) y así causar aglutinación. Las moléculas de IgG tienen un espacio más corto (15 nm) y normalmente son incapaces de aglutinar los eritrocitos sensibilizados suspendidos en solución salina; no obstante, la intensa sensibilización con IgG debida a alta densidad del antígeno disminuye las fuerzas repulsivas intercelulares y es capaz de promover la aglutinación en solución salina (p. ej., IgG anti-A, anti-B). La aglutinación de eritrocitos cubiertos tanto por IgM como por IgG aumenta por centrifugación. Sin embargo, es el procedimiento estándar para promover la aglutinación de eritrocitos sensibilizados por IgG por lo siguiente:

1. Reduciendo la distancia intercelular mediante pretratamiento de los eritrocitos con enzimas proteasas (p. ej., papaína o bromelina), que reducen la carga de la superficie celular de los eritrocitos (v. pág. 426).
2. Añadiendo polímeros (p. ej., albúmina), aunque el mecanismo por el que la albúmina u otros polímeros solubles en agua aumentan la aglutinación es incierto.

3. Creando puentes entre células sensibilizadas con un reactivo de antiglobulina en las pruebas de la antiglobulina (v. pág. 430).

Algunos anticuerpos que fijan complemento (especialmente IgM) pueden causar lisis *in vitro* (sin aglutinación perceptible), que puede ser favorecida por la adición de suero fresco como fuente de complemento. Sin embargo, la activación del complemento únicamente puede pasar hasta la fase C3; en estas circunstancias, el C3 unido a la célula puede ser detectado por la prueba de antiglobulina empleando un reactivo anticomplemento apropiado (v. pág. 430).

Control de calidad en el laboratorio

Desde hace tiempo se ha apreciado que las pruebas usadas para los análisis pretransfusionales rutinarios son de suma importancia, porque los errores pueden conducir y conducen a morbilidad y mortalidad del paciente. Por ello no debe sorprender que en la Unión Europea todos los reactivos, calibradores y materiales de control para la determinación del grupo sanguíneo y de la presencia de «anticuerpos antieritrocitos irregulares» hayan sido incluidos en la In-vitro Diagnostics (IVD) Medical Devices Directive[25] (v. también pág. 562). Esto quiere decir que todos los reactivos vendidos en la Unión Europea deben llevar la marca CE para demostrar que cumplen las especificaciones técnicas comunes (CTS) acordadas. En cada país europeo, la autoridad competente podrá retirar o suspender las certificaciones de cualquier agente, dependiendo de la información recibida desde su centro de notificación, que dará la aprobación para la puesta a la venta de los lotes y controlará el rendimiento del fabricante y del producto.

La llegada de esta directiva refuerza aún más las potenciales responsabilidades de un laboratorio individual, que asume la responsabilidad del producto de un fabricante, si los reactivos se hacen de «forma casera» o si los métodos recomendados por el fabricante no se siguen estrictamente.

La mayoría de los siguientes puntos han sido tomados de la guía del British Committee for Standards in Haematology (BCSH)[26,27] para pruebas de compatibilidad pretransfusionales:

1. Aspectos generales

a) El laboratorio debería documentar un sistema de calidad adecuado a sus necesidades.
b) Debería prestarse atención a la inclusión de controles internos en todas las pruebas realizadas.
c) El laboratorio debería participar en ejercicios de evaluación externa de la calidad.
d) El laboratorio debería hacer sólo uso de sistemas que hayan sido validados con requisitos documentados.
e) El laboratorio debería asegurar que tiene procedimientos para detectar fallos en los equipos informatizados y ordenadores. El laboratorio debería desarrollar procedimientos para incorporar controles en todos los puntos críticos de las pruebas transfusionales (p. ej., preservación de la identidad de las muestras del paciente, trascripción de los resultados, etc.).

2. Reactivos

a) El director del laboratorio debería referirse a las especificaciones disponibles para un reactivo determinado, por ejemplo, la International Society of Blood Transfusion (ISBT), la American Association of Blood Banks (AABB) o las «Guidelines for the Blood Transfusion Services»[28,29].
b) Todos los reactivos o sistemas deberían ser usados de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cuando esto no fuera posible, el procedimiento debería ser validado de acuerdo con la guía del BCSH sobre evaluación, validación e implementación de nuevas técnicas para la determinación del grupo sanguíneo, la detección de anticuerpos y pruebas cruzadas[30].
c) Debería haber un registro de todos los números de lote y fechas de caducidad de los reactivos usados en el laboratorio.

3. Técnicas

a) Todos los procedimientos usados deberían estar de acuerdo con la práctica recomendada como se resume aquí.
b) Es esencial que la técnica de antiglobulina escogida haya sido validada de acuerdo con los requisitos documentados del laboratorio y haya estado sujeta a minuciosos análisis de campo antes de ser introducida en el laboratorio[31].
c) Todos los cambios en las técnicas deben ser minuciosamente validados de acuerdo con la guía del BCSH sobre evaluación, validación e implementación de nuevas técnicas antes de ser introducidos para uso rutinario.
d) Los procedimientos normalizados de trabajo (PNT) autorizados por escrito, que cubran todos los aspectos del trabajo del laboratorio, deben estar disponibles y revisarse regularmente.
e) Los controles regulares y el mantenimiento de todos los equipos de laboratorio deben estar documentados. En particular, debería haber una procedimiento documentado de garantía de calidad para lavadoras de células (p. ej., usando el anti-D estándar del National Institute of Biological Standards and Control [NIBSC])[32] (v. página 591).

4. Formación y preparación del personal

a) Debería existir un programa documentado para formación del personal del laboratorio que cubra todos los PNT en uso y que cumpla los requisitos documentales del laboratorio.
b) El trabajo del laboratorio debería ser asumido sólo por personal apropiadamente entrenado.
c) Debería existir un programa documentado para evaluar la suficiencia del personal (p. ej., pruebas de repetición de la PAI), que deberían incluir indicadores para iniciar acciones de reciclado[33].

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

5. Auditoría y revisión de la práctica

a) Debería haber un sistema instaurado para documentar y revisar todas las incidencias de ausencia de cumplimiento de los procedimientos.

b) Los sistemas deberían permitir una completa auditoría de seguimiento de los pasos del laboratorio, incluyendo los resultados originales, interpretaciones, autorizaciones y todo el personal responsable de la realización de cada paso.

c) Debería ser llevado a cabo un programa de auditorías independientes para evaluar la conformidad con los procedimientos documentados «en casa».

6. Salud y seguridad

Cuando sea apropiado, los reactivos deberían haber sido evaluados para el virus de la inmunodeficiencia humana y el virus de la hepatitis B y C. Todas las muestras de alto riesgo deben ser manejadas de acuerdo con el código de seguridad del laboratorio (v. cap. 25).

Puntos generales de la técnica serológica

Suero frente a plasma

Para la detección de aloanticuerpos de eritrocitos es preferible el suero al plasma. No obstante, el plasma se usa cada vez más por la comodidad en la tecnología de microplacas y en los sistemas automatizados.

Cuando se emplea plasma, el complemento es inactivado por el anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Esto es relevante para la detección de algunos anticuerpos que fijan complemento (p. ej., de especificidad Kidd) que podría no detectarse o dar sólo reacciones débiles con anti-IgG en la prueba rutinaria de antiglobulina, pero puede ser fácilmente detectado por anti-complemento (v. pág. 430). Es por ello esencial optimizar la sensibilidad de las técnicas para detectar anticuerpos IgG débiles y validar el procedimiento antes de emplear plasma (v. página 431). Por ejemplo, en la detección de anticuerpos, puede conseguirse incrementar la sensibilidad mediante el uso de paneles celulares con expresión homocigota de los antígenos seleccionados (v. pág. 457).

Recogida y almacenaje de muestras de sangre

La identificación positiva de los pacientes y el cuidadoso etiquetado de las muestras de sangre son esenciales para evitar errores en la identificación. Para la determinación del grupo sanguíneo es deseable sangre venosa y deberían extraerse 5-10 ml de sangre y dejarla coagular a temperatura ambiente o anticoagular con EDTA en un tubo de cristal estéril. Esto proporcionará suero o plasma y eritrocitos. Si se requiere suero urgentemente, la muestra puede ser colocada en un baño de agua a 37 °C y centrifugada tan pronto como se vea que se ha empezado a formar y retraer el coágulo.

Almacenaje de suero o plasma

Debe ponerse gran cuidado en identificar y etiquetar correctamente cualquier muestra de suero o plasma separada de la muestra original.

Las muestras de sangre total se deterioran con el tiempo. Los problemas asociados con el almacenaje incluyen lisis de eritrocitos, pérdida del complemento en el suero, descenso de la potencia de los anticuerpos eritrocitarios, particularmente de los anticuerpos IgM, y contaminación bacteriana. Sin embargo, y sin pruebas definitivas, se ha sugerido que la sangre total puede almacenarse a temperatura ambiente hasta 48 h y a 4 °C hasta 7 días. Se recomienda que los laboratorios evalúen la estabilidad de los anticuerpos débiles, antes de tomar decisiones locales sobre las condiciones de almacenaje. El suero o plasma del paciente se almacena mejor congelado a –20 °C o menos en viales de plástico de 1-2 ml de volumen. La descongelación repetida de una muestra es peligrosa. Si el suero se ha conservado a –20 °C o menos, no se requieren precauciones con respecto a la esterilidad. El complemento se deteriora rápidamente en muestras almacenadas, pero cuando se separa el suero de la sangre tan rápido como sea posible y se conserva a –20 °C mantiene la mayor parte de la actividad del complemento durante 1-2 semanas. Para las pruebas de compatibilidad, las muestras de suero deberían separarse de los eritrocitos tan pronto como sea posible y conservarse a –20 °C hasta su uso, porque el contenido de complemento puede ser importante para la detección de algunos anticuerpos.

Suspensiones de eritrocitos

Solución salina de fuerza iónica normal

Generalmente se recomienda una suspensión al 2-3% de eritrocitos lavados en solución salina tamponada con fosfato (PBS) con pH 7,0. Las células suspendidas en solución salina con fuerza iónica normal (NISS) se usan rutinariamente para la titulación de anticuerpos, pero su uso en pruebas pretransfusionales rutinarias ha disminuido en la última década, dado que observaciones obtenidas de los ejercicios de evaluación externa de la calidad han demostrado que los laboratorios que emplean NISS tienen una tasa de detección de anticuerpos inferior que los que utilizan otras tecnologías[34].

Solución salina de baja fuerza iónica

Se sabe que la tasa de asociación de los anticuerpos con los antígenos de los eritrocitos se favorece disminuyendo la fuerza iónica del medio en el que se produce la reacción. Así, una importante ventaja de la solución salina de baja fuerza iónica (LISS) es que el período de incubación en la PAI (v. pág. 431) puede acortarse, mientras la sensibilidad para la mayoría de los anticuerpos contra antígenos de los eritrocitos se mantiene o incrementa. La solución LISS puede hacerse en el laboratorio (v. pág. 588) o comprarse comercialmente.

Existía una reticencia histórica a usar medios de baja fuerza iónica en los laboratorios de trabajo por dos razones: *a)* puede ocurrir aglutinación no específica cuando se usan concentraciones de NaCl inferiores a 2 g/l (0,03 mol/l), y *b)* con fuerzas iónicas bajas los componentes del complemento se unen a los eritrocitos.

Para evitar los resultados falsos positivos, deberían seguirse las siguientes reglas:

1. Los eritrocitos suspendidos en LISS y el suero o plasma deberían incubarse con volúmenes iguales; se recomienda emplear 2 volúmenes de células con 2 volúmenes de suero para asegurar la molaridad óptima en la prueba, del orden de 0,09 mol. Doblando la proporción suero:célula (disminuyendo a la mitad la concentración celular del 3 al 1,5%) se favorece la detección de algunos anticuerpos (p. ej., anti-K) que podrían de otro modo ser pasados por alto[35].
2. Los eritrocitos deberían lavarse en solución salina dos veces y luego una vez en LISS antes de preparar la suspensión celular en LISS al 1,5-2%.
3. La solución de trabajo de LISS debe estar preparada recientemente y debe mantenerse a temperatura ambiente.
4. La velocidad y el tiempo de centrifugación deberían ser óptimos para obtener la máxima sensibilidad sin reacciones falso-positivo o falso-negativo (v. pág. 433).

No es frecuente, pero aún pueden ocurrir reacciones falso-positivo con algunos sueros/plasmas. Si se utiliza plasma, el trabajo serológico posterior puede realizarse usando NISS; si se emplea suero, debería usarse anti-IgG en vez de reactivo antiglobulina poliespecífico.

Reactivos de eritrocitos

Para la determinación del grupo ABO y RhD, y del fenotipo Rh, así como para la detección e identificación de anticuerpos, se requieren eritrocitos de fenotipos seleccionados (v. cap. 20). Estas células se pueden obtener comercialmente o en centros de transfusiones sanguíneas.

Uso de células tratadas con enzimas

Los eritrocitos tratados con enzimas son reactivos útiles en la detección e investigación de autoanticuerpos y aloanticuerpos. Para este propósito se usan actualmente la papaína y la bromelina. Se sabe que el tratamiento enzimático incrementa la avidez de los anticuerpos, tanto IgM como IgG. Los receptores de algunos antígenos de los eritrocitos, sin embargo, pueden ser inactivados por el tratamiento enzimático (p. ej., M, N, S, Fy^b).

Las técnicas más sensibles son aquellas que usan eritrocitos lavados pretratados con enzimas (dos fases), que deberían igualar el rendimiento de la prueba de antiglobulina con LISS en tubo de centrifugación (v. pág. 431). La unión de técnicas de una fase e inhibición con papaína es relativamente insensible y no se recomiendan actualmente.

Existe una lista de centros[36] que disponen de un estándar de proteasa del ISBT/International Council for Standardization in Haematology (ICSH) y del método para su empleo.

Preparación de la solución de papaína (método de Low)

Una solución de papaína al 1% se prepara del siguiente modo: triturar 2 g de papaína en un mortero con 100 ml de tampón fosfato de Sorensen, pH 5,4 (v. pág. 589). Centrifugar durante 10 min y añadir 10 ml de clorhidrato de cisteína 0,5 mol/l al sobrenadante para activar la enzima. Diluir la solución hasta 200 ml con el tampón fosfato e incubar durante una hora a 37 °C. Dispensar la enzima en pequeños volúmenes (p. ej., 0,1-0,2 ml); esta suspensión se mantiene satisfactoriamente durante muchos meses a –20 °C, pero una vez descongelados los tubos, la solución que no se use inmediatamente debe desecharse.

La actividad enzimática debería estandarizarse usando un análisis con azoalbúmina[37], porque ésta determinará el tiempo de incubación para el tratamiento enzimático de las células. La preparación enzimática debería también compararse con el estándar de papaína del ISBT/ICSH usando el mismo lote de azoalbúmina, y así servir como un estándar «hecho en la casa»[36].

Método de papaína en dos fases

Para el método de papaína en dos fases[38], añadir a un tubo de plástico de 10 × 75 mm, 1 volumen de papaína al 1% (activada como se ha descrito anteriormente) a 9 volúmenes de tampón fosfato de Sorensen, a pH 7,0 (v. pág. 589). Incubar a 37 °C volúmenes iguales de papaína diluida recientemente y concentrado de eritrocitos lavados durante un período de tiempo que debe determinarse para cada lote de papaína dependiendo de la actividad de azoalbúmina; normalmente es 15-30 min. Después de la incubación, lavar las células con dos cambios de solución salina, a pH 7,0, y entonces diluir lo que se requiera hasta el 3% en NISS o el 1,5% en LISS. Para la prueba de NISS, añadir 1 gota de células suspendidas en NISS a 1 gota de suero. Para la prueba de LISS, añadir 2 gotas de células suspendidas en LISS a 2 gotas de suero. Incubar durante 15 min en un baño a 37 °C.

Preparación de solución de bromelina[39]

Preparar una solución al 0,5%, diluyendo bromelina en polvo en una mezcla de 9 volúmenes de solución salina y un volumen de tampón fosfato de Sorensen, pH 5,4 (v. página 589). Almacenar la solución en volúmenes de 0,5-1,0 ml a –20 °C; a esta temperatura se mantendrá durante meses. Como conservantes, añadir azida de sodio al 0,1% y actidiona al 0,5% (un fungicida). Añadir la bromelina al suero justo antes de añadir los eritrocitos, del mismo modo en que la papaína se añade en la técnica de Low. No es necesario pretratar los eritrocitos con la enzima. La actividad de la bromelina puede estandarizarse mediante un análisis con azoalbúmina como con la papaína.

Los *controles* son particularmente importantes cuando se usan células pretratadas con enzimas y deben usarse para establecer sin dudas que las células modificadas reaccionan apropiadamente con un suero con un contenido conocido de anticuerpos. Sólo de este modo puede evaluarse la potencia de la enzima y el método del tratamiento enzimático. Las células tratadas con enzimas son comparadas con células no tratadas, en reacciones con un control positivo (0,25 UI/ml de anti-D) y un control negativo (suero AB o suero fresco compatible).

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Aglutinación de eritrocitos por anticuerpos: un método básico

Las pruebas de aglutinación suelen realizarse en tubos o placas de microtitulación, usando centrifugación o sedimentación. Las pruebas en porta se usan a veces para determinaciones de emergencia del grupo ABO y RhD (v. págs. 453 y 454). Para pruebas en microplacas, véase página 454.

Pruebas en tubo

Añadir 1 volumen de suspensión de eritrocitos al 2% a 1 volumen de suero o dilución de suero en un tubo de plástico desechable o tubo de cristal. Mezclar bien y dejar reposar durante el tiempo apropiado (v. más adelante).

Tubos

Para pruebas de aglutinación, usar tubos de plástico desechables o de cristal de mediano tamaño (75 × 10 o 12 mm). Para las pruebas de lisis deberían usarse tubos similares, dado que es esencial tener una capa relativamente amplia de suero para mirar a su través, si tienen que detectarse pequeñas cantidades de lisis. El nivel de fluido debe subir muy por encima de la parte inferior cóncava de los tubos.

Los tubos de cristal deberían usarse siempre que su contenido tenga que calentarse a temperaturas de 50 °C o superiores o si se emplean solventes orgánicos. Los tubos de cristal, sin embargo, son difíciles de limpiar satisfactoriamente, en especial los tubos de pequeño calibre, y deberían seguirse cuidadosamente métodos de limpieza similares a los explicados en la página 695.

Temperatura y tiempo de exposición de los eritrocitos al anticuerpo

En la serología del grupo sanguíneo, las pruebas con tubo generalmente se hacen a 37 °C, temperatura ambiente o ambas. Es algo más ventajoso usar baños de agua a 20 °C, en vez de depender de la «temperatura ambiente», que en los diferentes países y estaciones puede variar desde 15 °C (o menos) a 30 °C (o más).

Las pruebas de sedimentación en tubo se leen normalmente en el transcurso de 1-2 h. Las aglutinaciones fuertes, sin embargo, serán obvias mucho antes. En las pruebas de centrifugación en tubo, la aglutinación puede leerse tras sólo 5-10 min de incubación si la mezcla de células y suero se centrifuga.

Pruebas en placas

Debido a la evaporación, las pruebas en placa deben leerse en 5 min. Para determinaciones rápidas del grupo ABO y RhD se usan normalmente reactivos que producen aglutinación fuerte en 1-2 min. Debido a que los resultados se leen macroscópicamente, deberían usarse suspensiones de células concentradas (35-45% de células en su propio suero o plasma).

Lectura de los resultados de las pruebas en tubo

Sólo el grado más intenso y completo de aglutinación (C) parece ser capaz de resistir un procedimiento de agitación sin cierto grado de rotura, lo que podría degradar la intensidad de la reacción. Por ello, el BCSH Blood Transfusion Task Force ha recomendado el siguiente procedimiento de lectura[40].

Lectura microscópica

Es esencial que se siga una técnica cuidadosa y estandarizada. Sacar el tubo cuidadosamente de su gradilla sin alterar el botón de células sedimentadas. Mantener el tubo verticalmente, introducir una pipeta Pasteur, con la punta cortada con un ángulo de 90°. Cuidadosamente retirar una columna de sobrenadante de aproximadamente 1 cm de longitud, y sin introducir ninguna burbuja de aire, retirar una columna de eritrocitos de 1-2 mm, colocando la punta de la pipeta en el botón de eritrocitos. Depositar suavemente el sobrenadante y las células en un portaobjetos sobre un área de 2 × 1 cm. Es importante no sobrecargar la suspensión con células y esto se consigue con el método descrito previamente.

En la tabla 19.12 se proporciona un esquema de la puntuación de los resultados.

Lectura macroscópica

En el método «macroscópico» se recomienda una suave agitación con inclinación y rotación. Es posible leer macroscópicamente las pruebas de aglutinación con la ayuda de un cristal de lectura manual o un espejo cóncavo, pero entonces resulta difícil distinguir reacciones más débiles que + (lectura microscópica) del aspecto normal, ligeramente granular, de los eritrocitos no aglutinados y en suspensión. Por ello, la lectura macroscópica proporciona valores de titulación inferiores a los de la lectura microscópica, aunque se recomienda la primera. Seguir el sistema de puntuación de la tabla 19.12.

A veces puede obtenerse una buena aproximación a la presencia o ausencia de aglutinación por inspección del depósito de células sedimentadas: un botón perfectamente redondeado y liso sugiere ausencia de aglutinación, mientras que la aglutinación produce grados variables de irregularidad, «granularidad» o dispersión del depósito (fig. 19.2).

Demostración de la lisis

Muchos anticuerpos contra grupos sanguíneos lisan los eritrocitos, en presencia del complemento, bajo condiciones adecuadas. Esto es particularmente cierto para los anti-A y anti-B, anti-P, anti-Le^a y Le^b, anti-PP_1P^k (anti-Tj^a) y ciertos autoanticuerpos (v. pág. 217). Si se necesita añadir complemento fresco, éste debería mezclarse con el suero problema antes de la adición de los eritrocitos. De no ser así, se produce aglutinación y el acceso al complemento podría bloquearse. La lisis debería valorarse al final del período de incubación, antes de la centrifugación de los tubos, si las células se han sedimentado de manera suficiente; la lisis puede ser valorada semicuantitativamente tras centrifugar las suspensiones y comparando el color del sobrenadante con el control.

Si se desea conocer si se ha producido lisis, el volumen final de la suspensión de células y suero tiene que ser mayor de lo que se requiere para la lectura de aglutinación.

Tabla 19.12. Puntuación de los resultados de las pruebas de aglutinación de eritrocitos

Símbolo	Puntuación de la aglutinación[a]	Descripción
4 + o C (completa)	12	Botón celular permanece en un grupo, macroscópicamente visible
3+	10	Botón celular dividido en varios grandes grupos, visibles microscópicamente
2+	8	Botón celular dividido en muchos grupos pequeños, visibles macroscópicamente
1+	5	Botón celular dividido en grupos finamente granulares, visibles casi macroscópicamente
(+) o w (débil)	3	Botón celular dividido en finos gránulos, visibles sólo microscópicamente[b]
–	0	Resultado negativo, todas las células están sueltas y uniformemente distribuidas

[a] La puntuación final es la suma de las puntuaciones de aglutinación para cada dilución.
[b] Puede clasificarse adicionalmente, dependiendo del número de células en el grupo (p. ej., grupos de 12-20 células [puntuación 3], 8-10 células [puntuación 2], 4-6 células [puntuación 1]. Ésta es la mínima aglutinación que debería considerarse positiva.

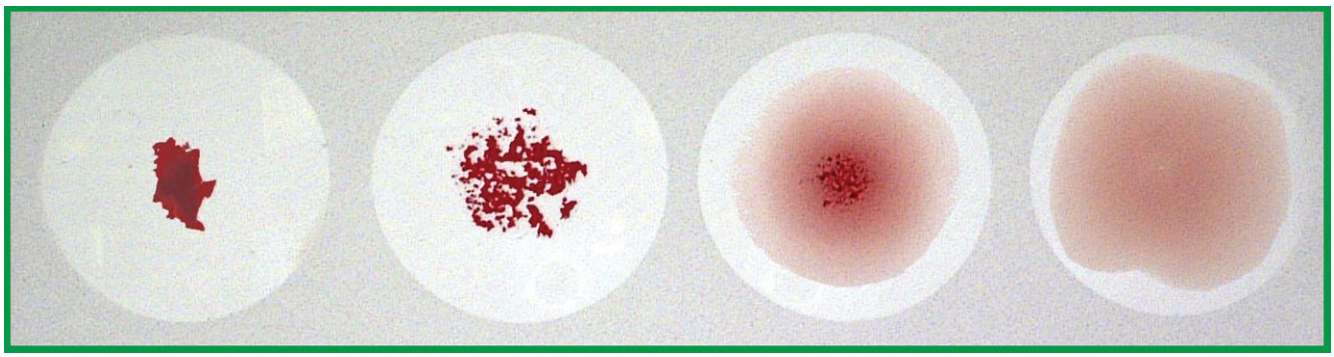


Figura 19.2. Aspecto macroscópico de la aglutinación en tubos con fondo redondeado. La aglutinación muestra distintos grados de «granularidad»; en ausencia de aglutinación, las células sedimentadas aparecen como un botón redondeado liso, como en el extremo derecho.

Deberían emplearse tubos (75 × 10 o 12 mm) y el nivel de la suspensión de células y suero debería subir muy por encima de la parte inferior cóncava de los tubos.

En las pruebas para actividad lítica puede requerirse una alta concentración de complemento. Por ello, en contraste con las pruebas para aglutinación, tiene ventajas usar una suspensión de eritrocitos más concentrada (aproximadamente un 5%). Las pruebas de lisis se suelen realizar a 37 °C pero, con anticuerpos fríos, podría ser apropiada una temperatura inferior (p. ej., 20 o 30 °C), dependiendo de la amplitud térmica de actividad del anticuerpo o, en el caso del anticuerpo de Donath-Landsteiner, 0 °C seguido de 37 °C (v. pág. 218).

Con ciertos anticuerpos el pH de la suspensión de células y suero afecta a la aparición de lisis. Para ellos, el pH óptimo es 6,5-6,8.

Controles

Es necesario asegurarse de que la lisis observada no es un artefacto (es decir, que la lisis es producida por el suero problema y no por el suero añadido como complemento) y que el complemento añadido es potente. Por ello es necesario un control de complemento (no el suero problema), como sería un control usando un suero que contenga anticuerpos líticos.

En las pruebas de lisis, debería ponerse gran cuidado en depositar la suspensión celular directamente en el suero. Si la suspensión celular entra en contacto con la superficie del tubo y se empieza a secar, este efecto, por sí solo, conducirá a lisis.

Prueba de antiglobulina

La prueba de antiglobulina (prueba de Coombs) fue introducida por Coombs, Mourant y Race en 1945[41], como un método para detectar anticuerpos anti-Rh «incompletos» (es decir, anticuerpos IgG capaces de sensibilizar a los eritrocitos, pero incapaces de causar aglutinación de las mismas células suspendidas en solución salina) en oposición a los anticuerpos IgM «completos», que aglutinan los eritrocitos suspendidos en solución salina.

Pueden realizarse las pruebas de antiglobulina directa e indirecta. En la prueba de antiglobulina *directa* (PAD), las célu-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

las del paciente, después de cuidadoso lavado, son analizadas para detectar la sensibilización que ha ocurrido *in vivo*; en la prueba de antiglobulina *indirecta* (PAI), los eritrocitos normales son incubados con el suero que se sospecha que contiene un anticuerpo y seguidamente analizadas, después de lavado, para detectar un anticuerpo fijado *in vitro*.

La prueba de antiglobulina es probablemente la prueba más importante del repertorio de las pruebas serológicas. La PAD se emplea para demostrar la unión de anticuerpos a los eritrocitos *in vivo*, como en la anemia hemolítica autoinmune (v. pág. 211), EHRN aloinmune (v. pág. 464) y la hemólisis aloinmune que sigue a una transfusión incompatible (v. pág. 471). La PAI tiene una extensa aplicación en la serología de la transfusión sanguínea, incluyendo la detección e identificación de anticuerpos y pruebas cruzadas.

Reactivos de antiglobulina

Reactivos poliespecíficos (amplio espectro)

La mayoría de los anticuerpos de eritrocitos son IgG no fijados a complemento; el anti-IgG es por ello un componente esencial de cualquier reactivo poliespecífico. No se requiere anti-IgA, porque siempre se producen anticuerpos IgG de la misma especificidad en presencia de anticuerpos IgA. Tampoco se requiere anti-IgM, porque los aloanticuerpos IgM clínicamente significativos, que no causan aglutinación en solución salina, son mucho más fácilmente detectados por el complemento al que están unidos.

Tradicionalmente, los anticomplemento (llamados anti-C3c y anti-C3d) se han considerado también esenciales. Sin embargo, si se usa plasma, sólo es necesario anti-IgG porque el EDTA impide la activación del complemento. Además, parece que la mayoría, si no todos, los anticuerpos detectados por la reacción C3-anti-C3 en pruebas de fuerza iónica normal pueden ser detectados con anti-IgG en polibreno polietilenglicol (PEG) y LISS. Los laboratorios que usan técnicas distintas al NISS han adoptado el uso de anti-IgG solos, apoyados en los cambios de la guía de la AABB en 1990 y del BCSH en 1996. Sin embargo, la guía de la BCSH hace hincapié en la importancia de haber hecho una detección de células con expresión homocigota de JK^a antes de decidir usar anti-IgG en vez de un reactivo antiglobulina poliespecífico. Para el diagnóstico de la anemia hemolítica autoinmune sí se requiere anti-C3 en las PAD.

Reactivos monoespecíficos

Los reactivos monoespecíficos pueden prepararse contra las cadenas pesadas de IgG, IgM e IgA y se conocen como anti-γ, anti-μ y anti-α; también se dispone de anticuerpos contra las subclases de IgG. Los anticuerpos específicos contra los componentes del complemento C4 y C3 y productos de degradación de C3 pueden prepararse como se mencionó previamente.

La principal aplicación clínica de estos reactivos monoespecíficos es definir las características inmunoquímicas de los anticuerpos. Esto es relevante para el mecanismo de la destrucción celular *in vivo,* y en el caso de IgG, las subclases tienen diferentes propiedades biológicas (v. pág. 424).

Control de calidad de los reactivos antiglobulina

El control de calidad de los reactivos antiglobulina debe siempre realizarse mediante la técnica exacta para la que se emplean. Todos los reactivos deberían utilizarse según las instrucciones del fabricante, a menos que se hayan estandarizado adecuadamente para otros métodos.

Para evaluar tanto los reactivos poliespecíficos antiglobulina humana como aquellos que contienen sus componentes monoespecíficos separados, existe un reactivo de referencia del ISBT/ICSH en polvo congelado[28]. La validación de un nuevo reactivo antiglobulina debería valorar las siguientes cualidades de los reactivos:

1. *Especificidad*. Los reactivos deberían sólo aglutinar eritrocitos sensibilizados con anticuerpos y/o cubiertos con niveles significativos de componentes del complemento.
2. *Potencia del anti-IgG por titulación serológica.*
3. *Especificidad y potencia de los anticuerpos anticomplemento*. Un reactivo poliespecífico debería contener anti-C3c y anti-C3d a niveles controlados para evitar reacciones falso positivo o un anti-C3d monoclonal potente apropiado (p. ej., BRIC-8). Debería contener poco o ningún anti-C4. Para valorar estas cualidades se requieren eritrocitos específicamente recubiertos con C3b, Cb3i, C3d y C4. Un grupo de trabajo del ISBT/ICSH ha publicado detalles de los procedimientos recomendados para la preparación de estas células[42].

Se reconoce que algunos bancos de sangre de los hospitales sean incapaces de evaluar un reactivo antiglobulina tan exhaustivamente como resumimos previamente. Sin embargo, deberían cumplir los siguientes requisitos mínimos de todos los nuevos reactivos antiglobulina:

1. Probar el reactivo antiglobulina para asegurar la ausencia de resultados falsos positivos simulando las pruebas cruzadas.
   a) Probar si hay un exceso de anti-C3d incubando suero fresco a 37 °C mediante las pruebas de NISS y LISS con 6 células ABO-compatibles de muestras de un donante CPD-A1 (10-30 días de antigüedad). Ésta es una prueba crítica para los resultados falsos positivos debidos a consumo de C3d en la sangre almacenada, que aumenta aún más con la incubación con suero fresco.
   b) Las pruebas para contaminación con anticuerpos de eritrocitos (contra células A_1, B y O lavadas) deben ser negativas. Continuar el proceso sólo si los reactivos antiglobulina han pasado las pruebas enumeradas previamente.
2. Comparar el reactivo antiglobulina con el reactivo usado actualmente, empleando una selección de anticuerpos débiles. Estos anticuerpos deben ser seleccionados de aquellos encontrados en el trabajo rutinario o pueden obtenerse de un centro de transfusión o laboratorio de referencia. Conservar dichos anticuerpos en pequeños volúmenes a 4 °C para pruebas repetidas.

3. Diluir un anti-D IgG débil (0,8 UI/ml), como el usado para controles de la prueba de antiglobulina rutinaria, desde no diluido (neto) a una dilución 1:16 y eritrocitos R_1r sensibilizados con cada dilución de anti-D. Estas células sensibilizadas (lavadas cuatro veces) deberían ser evaluadas con diluciones ordenadas de 1 a 8 de los reactivos de antiglobulina. Los reactivos antiglobulina deberían no mostrar prozonas en las pruebas de centrifugación inmediata usando 2 volúmenes de antiglobulina por prueba. La potencia de la antiglobulina probada debería al menos igualar al actual reactivo antiglobulina.

El reactivo antiglobulina de referencia del ISBT/ICSH puede ser usado para calibrar un reactivo antiglobulina «casero» y puede emplearse como un estándar rutinario.

El control de calidad de los reactivos antiglobulinas específicos de clase y subclase de Ig es más complejo, aun siguiendo los principios generales previamente enumerados. Los detalles de las técnicas apropiadas están fuera del alcance de este capítulo; los lectores deberían consultar la revisión de Engelfriet y cols.[43].

Procedimiento recomendado de la prueba de antiglobulina

Para la prueba de antiglobulina indirecta rutinaria se recomienda una técnica de centrifugación en tubo; el procedimiento que se describe aquí se basa en las *Guidelines for Compatibility Testing in Hospital Blood Banks* del BCSH[26,40]. La ejecución fiable se basa en el procedimiento correcto de cada fase de la prueba y en medidas de calidad y control apropiadas.

Las pruebas deberían realizarse en tubos de vidrio (75 × 10 o 12 mm). No se recomiendan tubos de plástico porque pueden absorber IgG, que podrían neutralizar las anti-IgG del reactivo antiglobulina.

1. *Eritrocitos sensibilizados* (no relevantes para la prueba directa) usando las siguientes proporciones suero:célula:
   a) Para el NISS, usar al menos 2 volúmenes de suero (preferiblemente 4) y un volumen de suspensión de eritrocitos al 3% lavados (3 veces) y suspendidos en PBS o NaCl a 0,15 mol/l (v. pág. 588).
   b) Para el LISS, usar 2 volúmenes de suero y 2 volúmenes de suspensión de eritrocitos al 1,5% lavados dos veces en PBS o NaCl a 0,15 mol/l y lavados una vez en LISS y posteriormente suspendidos en LISS (v. pág. 588).
   c) Para soluciones comerciales de aditivos de baja fuerza iónica, deben seguirse las instrucciones del fabricante.

   Dado que el volumen de «una gota» varía según el tipo de pipeta o frasco con cuentagotas, debería emplearse un volumen de gota conocido para asegurar que se mantiene una proporción adecuada de suero:células.

   Mezclar los reactantes agitándolos e incubar a 37 °C, preferiblemente en un baño de agua por un período mínimo de 15 min para la prueba en LISS y de 45 min para la prueba en NISS.
2. *Lavar las células que se van a evaluar* 4 veces con un mínimo de 3 ml de solución salina por lavado. Se necesita una inyección vigorosa de la solución salina para resuspender las células y conseguir una mezcla adecuada. Debería retirarse todo el sobrenadante posible tras cada lavado, para conseguir una dilución máxima del suero residual.
3. *Añadir 2 volúmenes de un reactivo antiglobulina adecuado* a cada tubo de la prueba y centrifugar justo después de mezclar concienzudamente. Las combinaciones de fuerzas centrífugas (FC) y el tiempo para la prueba de centrifugación en tubo son las siguientes:

FC (g)	100	200-220	500	1.000
Tiempo (s)	60	25-30	15	8-10

4. *Leer la aglutinación* como se describió previamente (v. pág. 428).
5. *El control de calidad de las pruebas* debería ser monitorizado de la siguiente manera:
   a) Como *control positivo*, una IgG anti-D diluida para dar reacciones 1+ o 2+ con células RhD-positivas (R_1r).
   b) Como *control negativo,* un suero con grupo AB inerte con las mismas células RhD positivas; no es esencial porque la mayoría de las pruebas son negativas.
   c) La adición de células sensibilizadas a todas las pruebas negativas. Esto es generalmente usado para detectar la neutralización del reactivo antiglobulina debida a la incompleta eliminación del suero en los pasos de lavado. El valor como control de esta prueba depende de la fuerza de la reacción de las células sensibilizadas. Las células control adecuadas sensibilizadas con IgG anti-D deberían dar una reacción 3+ cuando se analizan directamente con el reactivo antiglobulina y deberían mantenerse positivas (si el reactivo es potente) cuando se añade a pruebas negativas pero degradadas (1+ o 2+) debido al efecto de «células agrupadas» de las células no sensibilizadas. La reacción, por supuesto, será negativa si la antiglobulina ha sido neutralizada por el suero residual.

   La producción de células para servir de control de antiglobulinas satisfactorias[40] puede conseguirse limitando el nivel de sensibilización anti-D a aquel que da una prueba negativa en presencia de suero en solución salina en proporción 1:1.000.

   La idoneidad de las células control de antiglobulinas puede ser evaluada de la siguiente manera:
   - Preparar dos tubos (10 × 75 mm) con 1 volumen de células no sensibilizadas al 3%; lavar cuatro veces.
   - Añadir 2 volúmenes de antiglobulina a cada tubo, mezclar bien, centrifugar y leer los tubos para confirmar que la prueba sea negativa.
   - Añadir 1 volumen de suero en solución salina 1:1.000 en un tubo y 1 volumen de solución salina como control en otro tubo. Mezclar e incubar durante 1 min a temperatura ambiente.
   - Añadir 1 volumen de células control a cada tubo, mezclar, centrifugar y leer las pruebas.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

La prueba que contiene suero en solución salina 1:1.000 debería ser negativa, y el tubo control debería dar al menos una reacción 2+. Una reacción negativa con el tubo control sugiere un lavado deficiente y exige corrección del mismo. Si se emplea una centrífuga con lavado celular automático, la eficiencia del lavado debería comprobarse; véase el control de calidad de las centrífugas lavadoras de células[32,40].

Tecnología alternativa para la detección de anticuerpos por la prueba de antiglobulina

Han surgido técnicas alternativas que tienen una fase de lectura más simple que la lectura manual de la PAI en tubo con centrifugación. Hay dos tipos principales: los métodos de adherencia de eritrocitos en fase sólida[44] y las técnicas de aglutinación en columnas. La PAI en tubo con centrifugación es el estándar contra el que cualquier nuevo sistema debería ser comparado.

Los *métodos de adherencia de los eritrocitos en fase sólida* incluyen sistemas en que eritrocitos de fenotipos conocidos, que pueden también estar sensibilizados, son inmovilizados sobre una matriz sólida. En el método referido se preparan placas con tipajes ABO y RhD inmovilizando eritrocitos A_1, B y RhD positivos a tiras químicamente modificadas con fondo en U. Las células son posteriormente expuestas al anticuerpo apropiado y las monocapas de eritrocitos sensibilizados desecadas. Se añaden las células problema desconocidas y las placas son centrifugadas tras incubación. En una reacción positiva, las células se extienden sobre la superficie del pocillo porque se han adherido al anticuerpo fijado. En una reacción negativa, no hay adherencia y las células forman un pequeño botón en el centro del pocillo cuando se centrifugan las placas.

Para la determinación inversa del grupo sanguíneo y la detección de anticuerpos, se preparan y desecan monocapas de células de detección A_1, B y O. Se añade el suero problema y si tiene anticuerpos frente a cualquiera de los antígenos inmovilizados, éstos se unen a la monocapa. Las pruebas se leen tras la adición de células A_1B unidas a anti-IgG.

Los métodos en fase sólida son muy apropiados para la lectura automática mediante el paso de un rayo de luz a través del pocillo, que no será interrumpido por el botón de células en una prueba negativa, pero será dispersado por la capa de eritrocitos extendida en el pocillo en una prueba positiva.

En las t*écnicas de aglutinación en columna* se mezclan volúmenes muy pequeños de suero y células en un reservorio en la parte superior de una estrecha columna que contiene gel de Dextrano[a] o esferas de cristal[b]. Las columnas con un reservorio integrado son suministradas en forma de tarjeta o casete, respectivamente. Después de un adecuado período de incubación, las tarjetas/casettes que contienen las pruebas son centrifugadas en una centrífuga en la que el eje de la columna esté exactamente en línea con la fuerza centrífuga. Los eritrocitos, pero no el medio en el que están suspendidos, entran en la columna. Los eritrocitos aglutinados son atrapados en la parte alta de la columna y los no aglutinados forman una pastilla en la parte inferior de la columna (v. fig. 20.5, pág. 454).

Las columnas pueden contener también un reactivo antiglobulina para realizar las PAI o PAD. Los eritrocitos no tienen que ser lavados antes de entrar en contacto con el reactivo antiglobulina, debido a que durante la centrifugación sólo pasan a través del gel los eritrocitos y no el líquido de suspensión. Las columnas pueden también incluir un anticuerpo (p. ej., anti-D) para la determinación del grupo sanguíneo. Las células antígeno positivas son aglutinadas y atrapadas en la porción superior de la columna.

Las ventajas de la tecnología de aglutinación en columna son las siguientes:

1. Facilidad de uso y lectura; teóricamente puede ser realizada por personal relativamente poco entrenado.
2. Menor posibilidad de contaminación por aerosol de las muestras infectadas, debido a la ausencia de lavado celular antes de las PAI.
3. Las tarjetas pueden guardarse hasta 24 h, y es posible la revisión de los resultados por personal experimentado.
4. Facilidad de automatización e identificación positiva de las muestras.

Sin embargo, esta tecnología es cara y su realización en manos experimentadas no siempre es comparativamente mejor que el estándar PAI-LISS.

Valoración del rendimiento del trabajador individual

Se recomienda que todo el personal (incluido el personal de guardia que no trabaje rutinariamente en el banco de sangre) sea evaluado a intervalos regulares. Para este propósito puede emplearse un procedimiento basado en la repetición «ciega» de pruebas de antiglobulinas[33,40].

El procedimiento es el siguiente:

1. Titular una IgG anti-D de título bajo (8-16), como la usada para el control de la prueba de la antiglobulina, contra células RhD-positivas OR[1]r o para encontrar la dilución de anti-D que proporciona células sensibilizadas 1+ o 2+ (la mayoría de centros usan alrededor de 0,3 UI/ml). Para este propósito existe un reactivo de referencia anti-D estándar del BCSH–NIBSC (95/784)[46] (disponible en el NIBSC [v. pág. 591]).
2. Preparar un lote de células sensibilizadas (p. ej., incubando 16 ml de la dilución anti-D seleccionada con 8 ml de eritrocitos lavados OR[1] al 3% a 37 °C durante 45 min).
3. Etiquetar doce tubos para pruebas para realizar a ciegas por otra persona. Colocar un volumen de células al 3% sensibilizadas 1+ o 2+ y 2 volúmenes de suero inerte del grupo AB (para simular el volumen de suero usado en las pruebas rutinarias) en 9 tubos aleatorios, y seguidamente en los tubos restantes poner 1 volumen de células no sensibilizadas con 2 volúmenes de suero inerte del grupo AB. Anotar la posición de varias pruebas.

[a] DiaMed, AG, Suiza.
[b] Bio Vue, Ortho-Clinical Diagnostics, Nueva Jersey.

4. Lavar las células minuciosamente cuatro veces, añadir antiglobulina y centrifugar; leer a continuación los tubos.
5. Registrar el número de resultados falsos negativos (y falsos positivos) para cada operario y analizar en relación con la lectura o técnica de lavado. Es aconsejable dar clases inmediatas a cualquier operario con fallos en las pruebas de lavado o lectura, seguido de más análisis de repetición «ciega» para demostrar la mejoría en los procedimientos y restablecer la autoconfianza.

Titulación de anticuerpos

En la figura 19.3, se ilustra un método para preparar diluciones primarias de suero y llevar a cabo la posterior titulación de anticuerpos.

Los ejercicios de valoración de la calidad externos han demostrado el amplio intervalo de títulos obtenidos de una única muestra, reflejo de las diferentes sensibilidades de las tecnologías utilizadas, y también han destacado la falta de reproducibilidad[47]. Los puntos siguientes se han tomado de un apéndice de la guía del BCSH[48].

Preparación de diluciones seriadas de suero del paciente u otro suero

1. Todas las diluciones o titulaciones deberían hacerse usando pipetas calibradas con puntas diferentes para cada paso.
2. El diluyente debería ser solución salina tamponada a pH 7,0 para las pruebas de aglutinación; para las pruebas de lisis, el suero humano fresco normal ABO compatible no diluido debería acidificarse para que el pH de la mezcla de células y suero fuera de 6,8. El suero normal sirve como fuente de complemento.
3. El tamaño de los tubos y los volúmenes de análisis deberían ser escogidos para permitir una meticulosa mezcla de las diluciones.
4. Cuando se analicen muestras con títulos altos, debería hacerse una dilución inicial para reducir el número de duplicación doble progresiva a menos de 10. Debería escogerse un intervalo suficiente de diluciones para asegurar que pueden observarse dos resultados negativos.
5. El criterio de valoración debería ser macroscópico y bien definido. Cuando sea posible, debe considerarse el uso de ayudas para la comparación visual.
6. Cuando sea posible cada muestra debería ser analizada en paralelo con la muestra previa.
7. Las titulaciones deberían repetirse si existen diferencias en más de un tubo en los títulos obtenidos de las muestras secuenciales.

Adición de suspensiones de eritrocitos a diluciones del suero

Es convencional añadir 1 volumen de suspensión de eritrocitos a 1 volumen de suero o dilución de suero. Esto quiere decir que cada dilución de anticuerpos, y por ello el título «final», será el doble que la dilución del suero original. Debido a que la expresión de antígenos de los eritrocitos varía con la fuente y el tiempo de la muestra, siempre que sea posible debe usarse la misma muestra celular.

Prueba para la secreción de sustancia ABH

En la mayoría de la población se encuentran muchas distribuciones de sustancias con actividad antigénica apropiada A, B y H, en saliva y todos los fluidos corporales, controladas por un gen regulador secretor (Se), que se hereda independientemente de los genes ABH. Sólo alrededor del 20% de las personas son no secretoras. El estatus secretor individual puede ser determinado por análisis de la saliva.

Método

Diluir un suero anti-A o anti-B de manera que se obtenga una aglutinación bien visible con células A_2 o B tras una

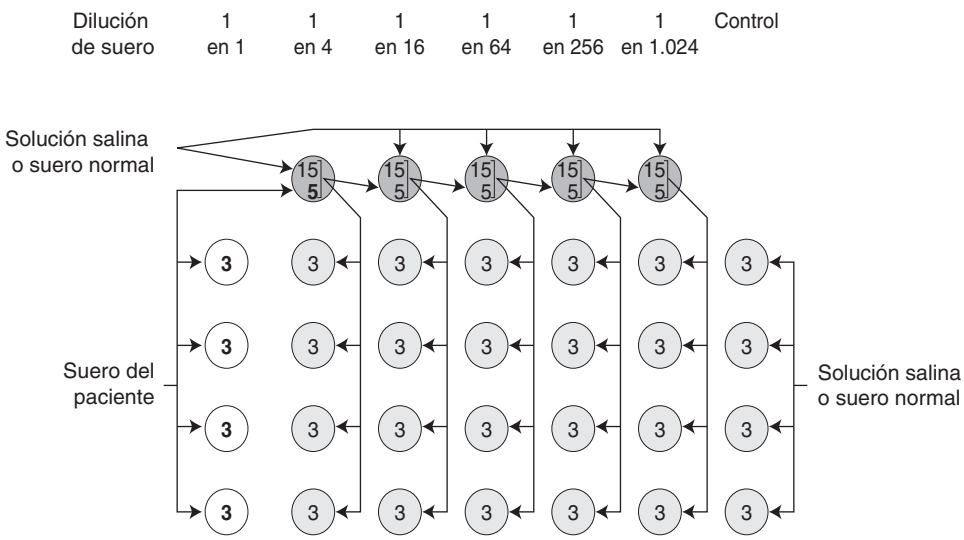


Figura 19.3. Diagrama que ilustra el método de preparación de cuatro series de cuatro diluciones de un suero. Los círculos grandes en la parte superior representan los tubos grandes en los que se hace la primera dilución; los círculos más pequeños representan los tubos en que se realizan las titulaciones. Los números representan gotas o volúmenes. El suero no diluido está indicado en negrita.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

hora a temperatura ambiente (p. ej., si el título de anticuerpos es 128, emplear una dilución 1:16).

Recoger varios mililitros de saliva en tubos de centrifugación. Colocar el tubo en agua hirviendo durante 10 min y después centrifugar. Hacer diluciones seriadas del sobrenadante en solución salina para conseguir diluciones entre 1:2 y 1:32. Usar un tubo sólo con saliva como control. Añadir un volumen igual del suero diluido anti-A (o anti-B) a cada tubo y tras agitación de la gradilla de tubos, mantenerlos a temperatura ambiente durante 10-15 min. Seguidamente, añadir un volumen igual de una suspensión de A_2 (o B) al 2% en solución salina en cada tubo. Mezclar los contenidos y mantener a temperatura ambiente durante 1-2 h; entonces valorar si se ha producido aglutinación. Si la saliva contiene sustancias A o B, la aglutinación normalmente se inhibe en todos los tubos excepto en el tubo de solución salina control.

La presencia de sustancia H puede demostrarse de manera similar usando un extracto de Ulex, *suero de anguila*, o el anticuerpo frío «incompleto» que se produce de forma natural como fuente de anti-H.

PLAQUETAS Y GRANULOCITOS

Sistemas aloantigénicos de plaquetas y granulocitos

Los aloantígenos de las plaquetas y los granulocitos pueden ser exclusivos de cada tipo celular (específico de célula) o compartidos con otras células. Los antígenos plaquetarios humanos (HPA) y los antígenos de neutrófilos humanos (HNA), actualmente reconocidos, se recogen en las tablas 19.13 a 19.15[49-51]. La nomenclatura histórica para los antígenos de los granulocitos utilizaba la letra N para indicar especificidad neutrofílica, y ésta se ha mantenido así, aunque se reconoce que muchos estudios usan granulocitos más que neutrófilos puros y muchos anticuerpos «específicos de neutrófilos» pueden también dirigirse contra precursores de granulocitos. En la nomenclatura de los HPA, se designaron HPA-1, -2, -3, -4 y -5 como sistemas aloantigénicos separados dialélicos. Los alelos de alta frecuencia de un sistema se designaron con la letra *a* y los alelos de baja frecuencia, con la letra *b*. Sin embargo, este sistema es difícil de reconciliar con el conocimiento de genética molecular actual, que sugiere que cada nuevo cambio de base no constituye un nuevo sistema aloantigénico dialélico, sino que define un alelo simple que expresa un nuevo epítopo simple. Actualmente, se han encontrado ocho alelos GPIIIa diferentes en los genes humanos, se han descrito tres variantes alélicas para GPIa y GPIIb y dos variantes alélicas para las subunidades GPIbα y GPIbβ. La página web del NIBSC (www.nibsc.ac.uk) dispone de una base de antígenos plaquetarios humanos. De los antígenos compartidos, el sistema HLA es el más importante clínicamente; sólo los antígenos de clase 1 (HLA-A, -B y en menor extensión -C) se expresan en las plaquetas y en los granulocitos. Los antígenos ABH se expresan también en las plaquetas (en parte, absorbidos del plasma) pero no pueden ser demostrados en los granulocitos.

Significado clínico de los anticuerpos de plaquetas y granulocitos

Los anticuerpos de las plaquetas y los granulocitos pueden ser clasificados de acuerdo con el estímulo antigénico (p. ej., alo-, iso-, auto- y anticuerpos inducidos por drogas).

Aloanticuerpos

La aloinmunización frente a antígenos de plaquetas y granulocitos es la mayoría de las veces consecuencia de una transfusión o embarazo. Los problemas clínicos asociados dependen de la especificidad del anticuerpo, que determina la célula diana implicada. Los aloanticuerpos específicos de una célula se asocian con condiciones clínicas bien definidas, que se resumen en las tablas 19.16 y 19.17.

La *trombocitopenia aloinmune fetal y neonatal* suele deberse a anti-HPA-1a y con menos frecuencia a anti-HPA-5b. La posibilidad de aloinmunización HPA-1a está fuertemente asociada con los HLA maternos de la clase–II tipo DRB3*0101 (DR52a)[52]. A las parejas se les debería ofrecer la realización del genotipo HPA, y si se es heterocigoto, con un hijo anterior gravemente afectado, debería considerarse la determinación del grupo HPA fetal en el primer trimestre del embarazo de la siguiente gestación usando el ADN de los amniocitos. Existen algunas pruebas de que la trombocitopenia grave se asocia con un título de anti-HPA-1a mayor de 32 en el tercer trimestre, empleando inmovilización con anticuerpos monoclonales de los antígenos plaquetarios (MAIPA)[53] (v. más adelante). En varias publicaciones se discuten estrategias potenciales para la detección rutinaria antenatal y la aceptabilidad y relación coste-efectividad de tales programas[53,54].

La *púrpura postransfusional* está causada con más frecuencia por anti-HPA-1a, pero puede estar asociada con anticuerpos anti-APH de otras especificidades contra HPA-1b, HPA-2b, HPA-3a, HPA-3b, HPA-4a y HPA-5b[55].

La *refractariedad inmunológica a las transfusiones plaquetarias* suele deberse a anticuerpos anti-HLA. Sin embargo, en pacientes multitransfundidos con inmunización HLA, hasta el 25% pueden tener también anticuerpos anti-HPA[56,57].

Isoanticuerpos

En raras ocasiones, tras transfusiones sanguíneas o embarazo, los pacientes con enfermedad de Glanzmann tipo I forman anticuerpos que reaccionan con glucoproteínas plaquetarias (GP) IIb/IIIa no presentes en sus propias plaquetas, pero sí en plaquetas normales (es decir, determinantes isotípicos)[58-61]. De manera similar, los pacientes con síndrome de Bernard–Soulier pueden formar anticuerpos contra determinantes isotípicas en GP Ib/V/IX no presentes en sus propias plaquetas[62]. Esto puede representar un grave problema clínico, porque podrían no encontrarse plaquetas compatibles para tratar episodios graves de sangrado.

Tabla 19.13. Genética molecular de los antígenos plaquetarios humanos (HPA)

Antígeno	Sinónimo de localización	Sustitución de glucoproteína	Sustitución de nucleótido	Aminoácido
HPA-1a	Zw^a, PI^{A1}	GPIIIa	T_{196}	Leu_{33}
HPA-1b	Zw^b, PI^{A2}		C_{196}	Pro_{33}
HPA-2a	Ko^b	GPIbα	C_{524}	Thr_{145}
HPA-2b	Ko^a Sib^a		T_{524}	Met_{145}
HPA-3a	Bak^a, Lek^a	GPIIb	$T_{2.622}$	Ile_{843}
HPA-3b	Bak^b		$G_{2.622}$	Ser_{843}
HPA-4a	Yuk^b, Pen^a	GPIIIa	G_{526}	Arg_{143}
HPA-4b	Yuk^a, Pen^b		A_{526}	Gln_{143}
HPA-5a	Br^b, Zav^b	GPIa	$G_{1.648}$	Glu_{505}
HPA-5b	Br^a, Zav^a, Hc^a		$A_{1.648}$	Lys_{505}
HPA-6bW	Ca^a, Tu^a	GPIIIa	$A_{1.564}$ $G_{1.564}$	Gln_{489} Arg_{489}
HPA-7bW	Mo^a	GPIIIa	$G_{1.317}$ $C_{1.317}$	Ala_{407} Pro_{407}
HPA-8bW	Sr^a	GPIIIa	$T_{2.004}$ $C_{2.004}$	Cys_{636} Arg_{636}
HPA-9bW	Max^a	GPIIb	$A_{2.603}$ $G_{2.603}$	Met_{837} Val_{837}
HPA-10bW	La^a	GPIIIa	A_{281} G_{281}	Gln_{62} Arg_{62}
HPA-11bW	Gro^a	GPIIIa	$A_{1.996}$ $G_{1.996}$	His_{633} Arg_{633}
HPA-12bW	Iy^a	GPIbβ	A_{141} G_{141}	Glu_{15} Gly_{15}
HPA-13bW	Sit^a	GPIa	$T_{2.531}$ $C_{2.531}$	Met_{799} Thr_{799}
HPA-15a	Gov^b	CD109	$C_{2.108}$	Ser^{703}
HPA-15b	Gov^a	CD109	$A_{2.108}$	Tyr^{703}
HPA-	Oe^a	GPIIIa		
HPA-	Va^a	GPIIIa		
HPA-	Pe^a	GPIbα		

GP, localización de los epítopos en la glucoproteína; HPA, antígenos plaquetarios humanos.

Autoanticuerpos

La *trombocitopenia autoinmune* puede ser idiopática o secundaria asociada con otras condiciones. La demostración de un autoanticuerpo plaquetario no es un requisito; incluso con las técnicas más adecuadas disponibles actualmente, los autoanticuerpos plaquetarios son difíciles de demostrar en una proporción variable de pacientes (10-20%). Los anticuerpos autorreactivos se dirigen contra epítopos de ciertas glucoproteínas. En el 30-40% de los pacientes se dirigen directamente contra epítopos del heterodímero de la integrina αIIbβ3, la glucoproteína plaquetaria (GP) IIb/IIIa (CD41) y en el 30-40% contra el receptor del factor Von Willebrand o el complejo GpIbα/GPIbβ/IX (CD42)[63-66].

En el diagnóstico de trombocitopenia autoinmune es importante considerar y excluir otras tres condiciones inmunológicas:

1. *Púrpura postransfusional (PTP).* Esta posibilidad viene sugerida por el antecedente de una transfusión en las 2 semanas previas[55].

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 19.14. Frecuencias de los antígenos plaquetarios humanos (%) en diferentes poblaciones

Antígeno	Holandesa	Finlandesa	Caucásica americana	Japonesa	Coreana
HPA-1a	97,9	99,0	98,0	100,0	99,5
HPA-1b	28,8	26,5	20,0	0,3	2,0
HPA-2a	100,0	99,0	97,0	99,2	99,0
HPA-2b	13,5	16,5	15,0	19,7	14,0
HPA-3a	81,0	83,5	88,0	85,1	82,5
HPA-3b	69,8	66,5	54,0	66,2	71,5
HPA-4a	100,0		100,0	100,0	100,0
HPA-4b	0,0		0,0	2,0	2,0
HPA-5a	100,0	99,5	98,0	99,0	100,0
HPA-5b	19,7	10,0	21,0	7,0	4,5
HPA-6a		100,0		99,7	100,0
HPA-6b		2,4		4,8	4,0

Tabla 19.15. Sistema de antígenos de neutrófilos humanos

Sistema antigénico	Fenotipo antigénico	Localización	Acrónimo	Frecuencia en caucásicos (%)
HNA-1	HNA-1a	FcγRIIIb	NA1	58
	HNA-1b	FcγRIIIb	NA2	88
	HNA-1c	FcγRIIIb	SH	5
HNA-2	HNA-2a	gp50–64	NB1	97
HNA-3	HNA-3a	gp70–95	5b	97
HNA-4	HNA-4a	CD11b	MART	99
HNA-5	HNA-5a	CD11a	OND	96

HNA, antígenos de neutrófilos humanos.

2. *Trombocitopenia inmune inducida por fármacos*. Es esencial la historia de los fármacos administrados al paciente. La trombocitopenia inducida por heparina (TIH) es la causa más frecuente de trombocitopenia inducida por fármacos y puede ser confirmada por la demostración mediante ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) de complejos de anticuerpos frente a heparina y factor plaquetario 4 (FP4)[67].
3. *Seudotrombocitopenia*. El paciente tiene un anticuerpo plaquetario dependiente de EDTA que es activo sólo *in vitro*. El anticuerpo (IgG y/o IgM) reacciona con antígenos ocultos (crípticos) en las GP IIb/IIIa, que quedan expuestos debido a cambios conformacionales en el complejo causados por la eliminación de Ca^{2+} por el EDTA[68]. Los anticuerpos causan aglutinación de las plaquetas en la muestra de sangre con EDTA, y en el frotis sanguíneo aparecen agregados plaquetarios o «satelitismo» plaquetario alrededor de los neutrófilos, lo que conduce en ambos casos a un recuento plaquetario falsamente disminuido. Para evitar esto, la sangre debería obtenerse en tubos con citrato.

La *neutropenia autoinmune* puede ser idiopática o secundaria. La neutropenia idiopática autoinmune es más frecuente en niños que en adultos, en los que habitualmente se asocia con otros trastornos que tienen en común un desequilibrio del sistema inmune[69]. Sin embargo, es la menos estudiada de las citopenias autoinmunes, porque es poco frecuente y por el hecho de que realizar análisis con granulocitos es difícil, largo, muy laborioso y caro.

Los anticuerpos antigranulocitos (normalmente IgG) son inusuales dado que a menudo tienen especificidades bien definidas para aloantígenos, especialmente NA1 o NA2[70]. Estos autoanticuerpos pueden suprimir los precursores de granulocitos en la médula ósea y causar neutropenia grave. Los estudios ante una sospecha de neutropenia autoinmune deberían, siempre que sea posible, incluir el estudio inmunológico de los granulocitos y un análisis de clonalidad (p. ej., CFU-GM) de los precursores de la médula ósea como células diana.

Anticuerpos inducidos por fármacos

Los anticuerpos inducidos por fármacos pueden causar anemia hemolítica (v. pág. 218), trombocitopenia o neutro-

Tabla 19.16. Significado clínico de los aloanticuerpos específicos de plaquetas[80]

1. Trombocitopenia aloinmune neonatal
2. Púrpura postransfusional
3. Refractariedad a transfusión de plaquetas. Usualmente debida a anticuerpos frente a los antígenos de los leucocitos

Tabla 19.17. Significado clínico de los aloanticuerpos específicos de granulocitos[112–114]

1. Neutropenia aloinmune neonatal
2. Reacción febril postransfusional (también implicados anticuerpos HLA)
3. Lesión pulmonar aguda relacionado con la transfusión (TRALI) (transfusión de títulos elevados de anticuerpo)
4. Corta supervivencia y mala funcionalidad de los granulocitos transfundidos (también implicados los anticuerpos HLA)
5. Neutropenia autoinmune; algunos anticuerpos tienen aloespecificidad para antígenos del sistema HNA

HLA, antígeno leucocitario humano; HNA, antígeno de neutrófilos humano.

Tabla 19.18. Cambios en el número de participantes en reuniones que emplean varias técnicas inmunológicas de plaquetas en los Australasian Platelet Workshops entre 1989 y 1998[75]

Técnica	1989	1992	1995	1998
PIFT microscopio	5	4	1	2
PIFT citometría de flujo	3	5	5	7
ELISA	5	2	0	0
SPRCA	3	5	10	8
Eliminación de HLA con cloroquina o ácido	3	12	11	9
Western blot	3	1	0	0
MAIPA o MACE	0	4	4	6
Panel de genotipos basado en ADN	0	0	7	8
N.º de participantes	14	17	15	14

ELISA, análisis de inmunoabsorción ligada a enzima; MACE, captura de antígenos modificada; MAIPA, inmovilización con anticuerpos monoclonales de los antígenos plaquetarios; PIFT, prueba de inmunofluorescencia plaquetaria; SPRCA, adherencia eritrocitos en fase sólida.

penia selectivas, o varias combinaciones de éstas en el mismo paciente[71,72].

Un fármaco puede causar una citopenia inmune por estimulación de la producción tanto de un *autoanticuerpo* (que reacciona directamente con la célula diana independientemente del fármaco en sí mismo) como de un *anticuerpo dependiente de un fármaco* (que destruye la célula diana por reacción de un complejo fármaco-membrana en la célula diana)[73]. Las pruebas de laboratorio pueden demostrar ambos tipos de anticuerpos en algunos pacientes[74].

Demostración de anticuerpos de plaquetas y de granulocitos

No hay un método único que detecte por igual todos los tipos de anticuerpos plaquetarios y granulocíticos. En la práctica, es útil tener un método básico de detección que detecte la mayoría de los anticuerpos que normalmente se producen, tanto ligados a la célula (prueba directa) como en suero (prueba indirecta), y complementarlo con otros métodos seleccionados para demostrar propiedades particulares de un anticuerpo y para medir la cantidad de anticuerpo fijado a la célula.

En la tabla 19.18 se muestran las distintas técnicas usadas en la última década por los participantes en los Australasian Platelet Workshops[75].

Aloanticuerpos

Las publicaciones de las reuniones nacionales e internacionales hacen posible realizar una guía para las pruebas inmunológicas plaquetarias. Los procedimientos básicos para demostrar los aloanticuerpos plaquetarios deberían incluir los siguientes:

1. *Prueba de plaquetas para anticuerpos reactivos con plaquetas*. La reunión de trabajo del ISBT/ICSH sobre serología plaquetaria[76] recomendaba como estándar para la evaluación de otras técnicas de anticuerpos plaquetarios la prueba de inmunofluorescencia de suspensión plaquetaria[77].

   Es importante combinar un análisis sensible para detectar fijación, tal como la prueba de inmunofluorescencia plaquetaria (PIFT), con un método de captura del antígeno, como el MAIPA[78], para incrementar las posibilidades de detectar anticuerpos débiles o aquellos que reaccionan con relativamente pocos lugares antigénicos.
2. *Prueba de linfocitos para detectar anticuerpos HLA*. Dado que los anticuerpos HLA también reaccionan con plaquetas, en el procedimiento de detección de anticuerpos básico, deberían incluirse análisis de citotoxicidad de linfocitos y/o ELISA.
3. *Pruebas para diferenciar anticuerpos específicos plaquetarios de los HLA*. La técnica de MAIPA que emplea anticuerpos monoclonales apropiados es particularmente útil para separar muestras de anticuerpos reactivos con plaquetas (v. pág. 443). La técnica de «denudado» con cloroquina para inactivar las moléculas HLA de clase I en las plaquetas[79] es también útil a este respecto (v. pág. 442). Las técnicas convencionales serológicas (p. ej., reacciones diferenciales con un panel de plaquetas y linfocitos normales; absorción diferencial de anti-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

cuerpos HLA, etc.) pueden también utilizarse para diferenciar anticuerpos específicos de célula y HLA, pero son menos útiles para la detección rápida que la técnica de «denudado» con cloroquina.

La caracterización adicional de los anticuerpos específicos plaquetarios requerirá remitirlos a un laboratorio de referencia. La identificación de especificidades alogénicas debería hacerse, como con los anticuerpos de eritrocitos, mediante reacción con un panel de genotipos seleccionados de plaquetas del grupo O, preferiblemente con referencia al genotipo plaquetario del paciente.

Una importante consideración en la serología plaquetaria es la existencia ocasional de anticuerpos contra antígenos ocultos (crípticos) del complejo GP IIb/IIIa, que quedan expuestos por fijación con EDTA y paraformaldehído (PFA)[80]. Estos anticuerpos, que son activos sólo *in vitro*, son impredecibles, pero cuando se sospeche su existencia, pueden evitarse usando pruebas con plaquetas no fijadas de sangre recogida con citrato.

La detección e identificación de los aloanticuerpos de los granulocitos deberían ser reservadas para laboratorios de referencia con experiencia, pero deberían seguir un esquema similar con el uso de inmovilización de anticuerpos monoclonales de antígenos de granulocitos (MAIGA)[81,82] o adsorción del suero con muestras de plaquetas para diferenciar entre anticuerpos específicos de los granulocitos y HLA.

Autoanticuerpos

La detección de autoanticuerpos y anticuerpos inducidos por fármacos requiere una consideración especial.

Cuando se buscan autoanticuerpos plaquetarios (o antigranulocitos), puede llevar a errores probar el suero del paciente sólo contra plaquetas (granulocitos) normales, porque por la presencia de aloanticuerpos (p. ej., HLA o específicos de célula) inducidos por transfusiones previas o embarazos pueden producirse reacciones positivas. Es importante demostrar que un autoanticuerpo del suero del paciente reacciona con las células propias del paciente. Idealmente, debería realizarse un PAD (p. ej., PIFT), antes de realizar el tratamiento, para el anticuerpo fijado *in vivo*. Cuando existe una citopenia grave, puede ser imposible obtener suficientes células para la prueba; sin embargo, las muestras de suero deberían almacenarse a –20 °C y ser probadas retrospectivamente contra las células del paciente cuando el recuento plaquetario (o de neutrófilos) periférico se haya incrementado como respuesta al tratamiento.

De más interés en la autoinmunidad plaquetaria ha sido la medición cuantitativa de las inmunoglobinas asociadas a plaquetas como un indicador de sensibilización *in vivo*. Una crítica de estos métodos cuantitativos es que detectan no sólo anticuerpos plaquetarios, sino también Ig no específicamente atrapadas o fijadas a las plaquetas y fragmentos plaquetarios[83] y, por ello, generalmente no son específicas en el diagnóstico de trombocitopenia autoinmune[84]. Ahora es más habitual usar la PIFT directa[85,86] usando citometría de flujo. Las plaquetas del paciente se incuban con conjugados marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) específicos de isotipos (anti-IgG, anti-IgM y anti-IgA) y la prueba se considera positiva cuando la intensidad de la fluorescencia es superior a la media + 2DE cuando se compara con los resultados obtenidos con suspensiones de mezclas de plaquetas de 10 o más donantes normales. En un estudio llevado a cabo con 75 pacientes con púrpura trombocitopénica idiopática usando microscopia en lugar de citometría de flujo, Von dem Borne y cols.[87] encontraron una PIFT directa positiva débil (± a +) en el 60% de los pacientes y reacciones intensas (++ a ++++) en sólo el 26% de los pacientes. En el mismo estudio, la PIFT indirecta fue positiva con el suero del paciente en el 66% de los casos que tuvieron un PIFT directo positivo y fue positiva con una elución de éter de las plaquetas del paciente en el 94% de los mismos casos. Aunque estos resultados pueden reflejar una relativa insensibilidad del método, también pueden deberse a un anticuerpo de baja afinidad que es fácilmente eluido durante el procedimiento del análisis[83] o en algunos casos indicar un mecanismo inmune alternativo de la trombocitopenia.

La clase de Ig de los autoanticuerpos plaquetarios es similar en la trombocitopenia autoinmune idiopática y secundaria; mayoritariamente es IgG (92%), pero a menudo (también) es IgM (42%) y a veces (también) IgA (9%)[87]. Se detectan todas las subclases de IgG, pero las más frecuentes son IgG1 y/o IgG3.

El modo más efectivo de detección de anticuerpos antigranulocitos es mediante una combinación de la prueba de inmunofluorescencia de granulocitos (GIFT)[88] y la prueba de aglutinación de granulocitos (GAT)[89]. Sin embargo, los complejos inmunes y los agregados en el suero del paciente pueden todavía producir resultados falsos positivos. Esto puede ser un problema con el suero de pacientes adultos con neutropenia autoinmune secundaria, que deberían también ser evaluados para detectar la presencia de complejos inmunes (p. ej., *Clq-enzyme-linked immunosorbent assay*). La prueba de quimioluminiscencia de granulocitos (PQLG)[90] es relativamente insensible a la presencia de complejos inmunes cuando se emplea suero inactivado, pero es incapaz de detectar anticuerpos IgM. Varias revisiones proporcionan una valoración de las técnicas disponibles para detectar anticuerpos y antígenos específicos de granulocitos[91,92].

Anticuerpos inducidos por fármacos

La investigación serológica de la trombocitopenia (neutropenia) inmune inducida por fármacos sigue el mismo patrón que la anemia hemolítica (v. pág. 218), con la excepción de que no siempre es posible obtener suficientes células para la prueba cuando existe trombocitopenia o neutropenia. Son necesarias las siguientes muestras de sangre:

1. *Muestra de sangre de la fase aguda cuando el recuento celular está más disminuido.* Si hay pocas células para comprobar a la vez la unión de anticuerpos y complemento a la célula, es necesario analizar el suero de la fase aguda contra las células del paciente durante la remisión. Estas pruebas demostrarán la base inmune de la citopenia.

Si el suero del paciente de la fase aguda se enfrenta a células de donantes *normales*, es esencial tener en cuenta las reacciones positivas debidas a aloanticuerpos HLA o específicos de célula en el suero del paciente. Además, resultados negativos con células de donantes normales pueden ser el resultado de ausencia del antígeno para al anticuerpo dependiente del fármaco particular (p. ej., debido a restricción genética del antígeno afectado)[93].

2. *Muestras posteriores tras interrumpir el fármaco.* Idealmente, el muestreo debería hacerse cuando el fármaco se haya suspendido y el anticuerpo sea todavía detectable. Las pruebas empleando esta muestra, con o sin el fármaco en el sistema de análisis, son necesarias para demostrar el papel que desempeña el fármaco en la producción de la citopenia inmune. El fármaco puede añadirse directamente al sistema de análisis (e incluirse en la solución de lavado) o las células podrían ser pretratadas con el fármaco. Para algunos fármacos, el antígeno apropiado para la prueba es un metabolito y no el fármaco original; en estos casos puede usarse un antígeno del fármaco *ex vivo* de la orina o del plasma[94].

Métodos de demostración de anticuerpos

Los métodos básicos de inmunofluorescencia con antiglobulina y el análisis MAIPA se describirán en detalle. Sólo se hará una breve mención de otros métodos.

Método de inmunofluorescencia con antiglobulina

Los métodos de inmunofluorescencia con antiglobulinas se basan en la técnica convencional de antiglobulinas (v. página 430) y son útiles para serología de plaquetas[77], granulocitos[88] y linfocitos[95]. PIFT y GIFT[c] se describen en detalle en este capítulo.

Estas pruebas pueden leerse por examen directo de las células en suspensión, usando microscopio de fluorescencia, o por citometría de flujo. Estas pruebas pueden detectar aloanticuerpos, autoanticuerpos y anticuerpos inducidos por fármacos, y mediante el uso de reactivos antiglobulina monoespecíficos apropiados pueden determinar la clase de Ig y la subclase del anticuerpo y los componentes del complemento fijados a la célula. Ambas pruebas pueden usarse con células tratadas con cloroquina para diferenciar anticuerpos específicos de célula de los HLA[96].

Células del paciente y del panel de detección

Las plaquetas y los granulocitos se preparan de sangre venosa obtenida en Na_2-EDTA al 5% (p/v) en agua (9 volúmenes de sangre:1 volumen de anticoagulante).

Para la serología plaquetaria el panel de células de detección debería obtenerse de donantes del grupo O con el fin de evitar reacciones positivas debidas a anti-A y anti-B, pero esta medida no es necesaria para la serología de los granulocitos porque los antígenos A y B no se encuentran en los granulocitos. Si el suero de un paciente debe analizarse con plaquetas con incompatibilidad ABO, los anti-A y/o anti-B pueden absorberse con las sustancias de eritrocitos A o B correspondientes.

Los mejores resultados se obtienen con las preparaciones de células más recientes, pero se acepta algún retraso (v. más adelante). Los neutrófilos son más susceptibles que las plaquetas al daño por el paso del tiempo; las células deberían fijarse (v. más adelante) el día de la obtención, pero la serología puede retrasarse al día siguiente. Las plaquetas son más resistentes, y una muestra de sangre anticoagulada puede ser adecuada para la prueba hasta después de 2 días a temperatura ambiente (20 °C). Una vez fijadas, las plaquetas pueden mantenerse durante 3-4 días a –40 °C durante al menos 2 meses; sin embargo, tras descongelación de las plaquetas se produce algún daño en la membrana, que causa aumento de la fluorescencia original, lo que podría limitar la sensibilidad de la prueba[97,98]. Para tiempos más prolongados, debe usarse un crioprotector (p. ej., DMSO)[98].

Suero del paciente

El suero de la sangre venosa coagulada debería ser calentado a 56 °C durante 30 min para inactivar el complemento y conservado en volúmenes de 1-2 ml a –40 °C (para evitar descongelación repetida de los depósitos).

Suero control

El suero de *control negativo* se prepara a partir de un grupo de 10 sueros de donantes normales masculinos del grupo AB que nunca hayan sido transfundidos. EL suero de *control positivo* con anticuerpos específicos plaquetarios (p. ej., anti-HPA-1a), anticuerpos específicos de granulocitos o anticuerpos HLA multiespecíficos debería obtenerse de los centros de referencia.

Elución de las células sensibilizadas del paciente

La elución es importante para confirmar la naturaleza de los anticuerpos de la inmunoglobulina fijada a la célula y para determinar la especificidad de los anticuerpos. Esto se aplica especialmente cuando no se demuestran anticuerpos en el suero del paciente, lo que a menudo ocurre en pacientes con trombocitopenia y neutropenia autoinmune.

Se ha empleado la elución por descenso del pH del medio, con éter (o DMSO) y por calentamiento a 56 °C[99]. Para serología plaquetaria rutinaria, lo más conveniente es la elución con éter para los autoanticuerpos plaquetarios o el calentamiento a 56 °C para aloanticuerpos específicos de plaquetas.

Elución por calor

Incubar las plaquetas o los granulocitos suspendidos en 0,5 ml de albúmina de suero bovino (ASB) al 0,2% en PBS durante 60 min a 56 °C. Centrifugar y retirar el sobrenadante que contiene el anticuerpo eluido.

Elución con éter

Empleando tubos de cristal o plástico, mezclar plaquetas lavadas y concentradas obtenidas de 50 ml de sangre con EDTA con una parte de PBS/ASB (0,2%) y dos partes de éter, mediante agitación vigorosa durante 2 min. Incubar la mezcla durante 30 min a 37 °C en un baño con agitación

[c] Fison Ltd., Loughborough, Reino Unido.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

continua. Después de la centrifugación (2.800 g, 10 min), se forman 3 capas, formadas por éter, estroma y eluido. Pipetear el eluido con una pipeta Pasteur y evaluarlo en la PIFT indirecta con plaquetas de donante normal como se describe para el suero.

Preparación de las plaquetas

1. Preparar plasma rico en plaquetas (PRP) mediante centrifugación de sangre anticoagulada (200 g, 10 min).
2. Lavar las plaquetas tres veces (2.500 g, 5 min) en tampón PBS/EDTA (8,37 g de Na_2-EDTA disuelto en 2,5 l de PBS, pH 7,2); resuspender las plaquetas minuciosamente cada vez.
3. Fijar las plaquetas en 3 ml de solución de paraformaldehído al 1% durante 5 min a temperatura ambiente. Una solución madre de PFA se prepara disolviendo 4 g de PFA (BDH) en 100 ml de PBS mediante calentamiento a 70 °C y mezclado esporádico. Añadir NaOH 1 mol/l gota a gota y mezclar continuamente hasta que la solución se aclare. Esta solución madre al 4% puede ser conservada a 4 °C protegida de la luz varios meses. Preparar una solución de trabajo de PFA al 1%, añadiendo 1 volumen de solución madre de PFA al 4% a 3 volúmenes de PBS y corregir el pH si es necesario hasta 7,2–7,4 con HCl 1 mol/l.

Lavar las plaquetas dos veces como se ha descrito previamente y resuspender en tampón PBS/EDTA a una concentración de 250-500 × 10^9/l para usar en la PIFT.

Preparación de granulocitos

1. Mezclar sangre anticoagulada o sangre guardada de la preparación de plaquetas después de retirar PRP (y reconstituir a su volumen original con PBS) con 2 ml de solución Dextrano por 10 ml de sangre (Dextrano 150 inyección BP en 5% dextrosa). Incubar esta mezcla a 37 °C durante 30 min con un ángulo de unos 45° para acelerar la sedimentación de los eritrocitos, y entonces retirar el sobrenadante rico en leucocitos (SRL).
2. Los granulocitos pueden separarse por sedimentación de doble densidad (fig. 19.4). El SRL se deposita en 2 ml de medio de separación de linfocitos (MSL) (MSL = Ficoll-Hypaque ge: 1,077), que a continuación se deposita sobre 2 ml de un medio de resolución de mono y polis (MPRM) (MPRM = Ficoll-Hypaque ge: 1,114)[d]. El tubo con este gradiente de densidad se centrifuga a 2.500 g durante 5 min. Los granulocitos forman una capa opaca en la interfase MSL/MPRM de la que son recogidos con pipeteo cuidadoso (el examen microscópico muestra que las células de esta capa son predominantemente polimorfos neutrófilos). Los linfocitos pueden también ser recogidos de manera similar de la interfase plasma/MSL (p. ej., para usar en la prueba de inmunofluorescencia con linfocitos o LIFT)[95].
3. Lavar los granulocitos tres veces a 400 g durante 5 min en tampón PBS/ASB (PBS pH 7,2 con ASB 0,2%).

[d] MSL y MPRM suministrados por Flow Laboratories Ltd.

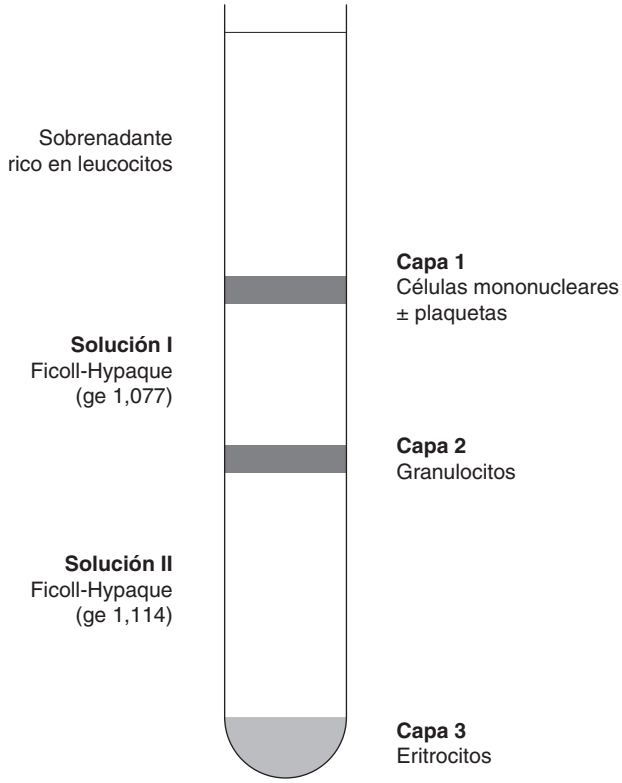


Figura 19.4. Separación con doble densidad de linfocitos y granulocitos. El sobrenadante rico en leucocitos es separado en capas con Ficoll–Hypaque con una gravedad específica (ge) de 1,077 (Solución 1) y 1,114 (Solución 2) y después centrifugado a 2.500 g durante 5 min. Concentrado de linfocitos en capa 1; concentrado de granulocitos en capa 2.

4. Fijar los granulocitos en 3 ml de PFA al 1% durante 5 min a temperatura ambiente.
5. Lavar los granulocitos dos veces como antes y resuspender en tampón PBS/ASB a una concentración de alrededor de 10 × 10^9/l para usar en el GIFT.

Pruebas de inmunofluorescencia de plaquetas y granulocitos

Los métodos serológicos para analizar plaquetas y granulocitos en las pruebas de inmunofluorescencia en suspensión son similares, excepto que las plaquetas son lavadas siempre en tampón PBS/EDTA y los granulocitos en tampón PBS/ASB. En la figura 19.5 se muestra un diagrama de flujo de la PIFT.

Los reactivos antiglobulina marcados con FITC se usan como sigue: anti-Ig (poliespecífico), anti-IgG, anti-IgM y anti-C3. Deberían usarse fragmentos $F(ab)_2$ de estos reactivos para minimizar la fluorescencia de membrana no específica debida a unión al receptor Fc, que constituye un problema especialmente con los granulocitos. La dilución óptima para cada reactivo debería ser determinada por titulación en damero. Centrifugar los conjugados FITC a 2.500 g durante 10 min antes de utilizarlos, para retirar la

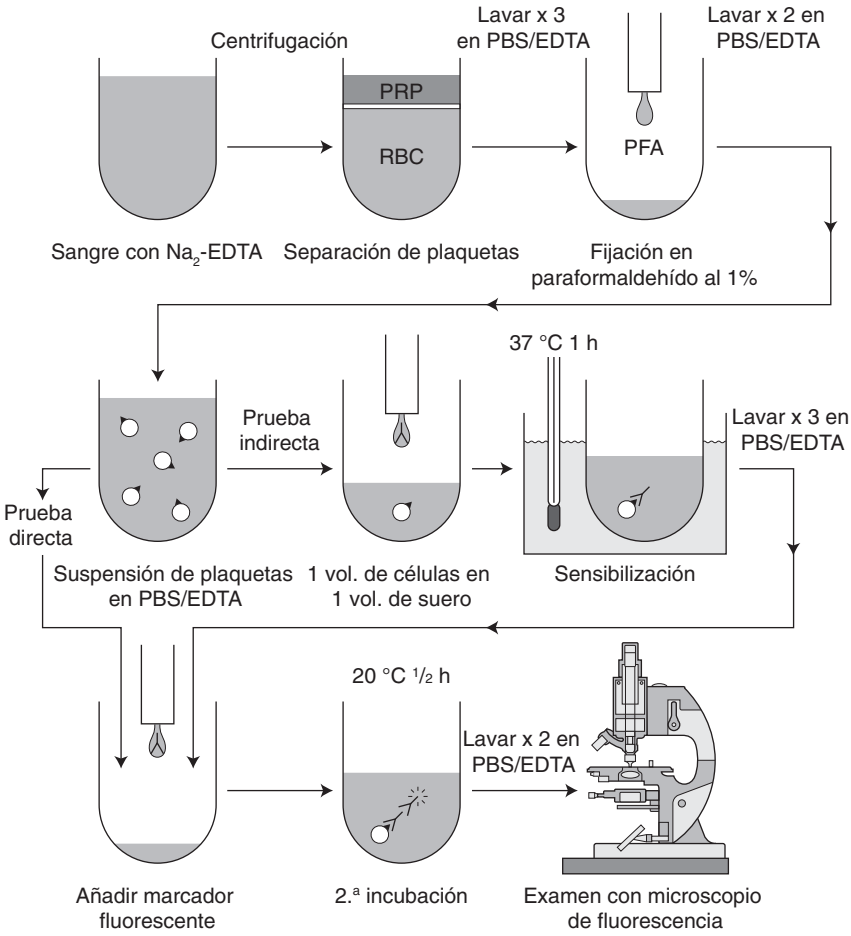


Figura 19.5. Prueba de inmunofluorescencia plaquetaria. PBS, solución salina tamponada con fosfato; PFA, paraformaldehído; PRP, plasma rico en plaquetas; RBC, eritrocitos.

fluorescencia residual y reducir la fluorescencia de fondo. En cada batería de pruebas deberían incluirse controles positivos y negativos (como se describe más arriba).

Pruebas indirectas

1. Mezclar 0,1 ml de suero y 0,1 ml de suspensión celular, como se preparó previamente, en tubos de precipitado de plástico (7 × 50 mm). (El método puede también ser adaptado para emplearse con placas de microtitulación, las cuales tienen la ventaja de emplear volúmenes más pequeños.)
2. Incubar durante 30 min a 37 °C para pruebas de IgG y C3, y a temperatura ambiente para pruebas de IgM. *Sólo* para las pruebas de C3, sedimentar las células (1.000 g, 5 min), retirar el sobrenadante y resuspender el botón celular en 0,1 ml de suero humano descongelado recientemente como fuente de complemento. Incubar durante 30 min a 37 °C.
3. Lavar las células tres veces a 1.000 g, durante 5 min con el tampón apropiado (PBS/EDTA para plaquetas, PBS/ASB para granulocitos); decantar el sobrenadante final. Este paso y los siguientes son comunes para las pruebas indirectas (es decir, el suero del paciente con las células del donante) y las pruebas directas (es decir, las células propias del paciente para detectar sensibilización *in vivo*).
4. Añadir el reactivo antiglobulina fluorescente (0,1 ml de la dilución apropiada determinada por titulación en damero), mezclar el botón celular y dejar a temperatura ambiente durante 30 min en la oscuridad.
5. Lavar dos veces como antes y retirar el sobrenadante.
6. Mezclar 0,5 ml de glicerol-PBS (3 volúmenes de glicerol:1 volumen de PBS) con el botón celular y colocar sobre un portaobjetos con un cubre.
7. Examinar al microscopio usando un objetivo ×40 e iluminación ultravioleta epifluorescente.

Puntuación de los resultados

Las reacciones en la PIFT y la GIFT pueden ser puntuadas en un escala desde negativas (–) hasta distintos grados de positividad desde + a + + + +. Aunque es subjetivo, este método de puntuación en manos experimentadas puede conseguir resultados semicuantitativos en la PIFT[100].

En general, las plaquetas y granulocitos normales incubados con suero AB no se hacen fluorescentes después de incubación con un reactivo antiglobulina FITC apropiadamente diluido. A veces, el control negativo puede mostrar picos débiles de fluorescencia (hasta dos puntos de fluorescencia en algunas células); en estos casos el resultado de la prueba sólo es calificado como positivo si es claramente más intenso que el control negativo (suero AB). La fluores-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

cencia más intensa en el control negativo debería suscitar dudas sobre la calidad de la prueba.

Uso de la citometría de flujo

Con la simplificación de la citometría de flujo y mejoría de los programas informáticos, esta técnica se usa cada vez más como primera forma de análisis de la PIFT por los laboratorios de referencia de plaquetas, porque su sensibilidad ha mejorado. Sin embargo, es más difícil trabajar con citometría de flujo con plaquetas que con otras células, y debe prestarse particular atención para prevenir la agregación y asegurar suspensiones de células individualizadas. La presencia de partículas plaquetarias y detritus puede también causar confusión. Las consideraciones técnicas en la aplicación de la citometría de flujo al estudio plaquetario ha sido objeto de varias revisiones[85,86].

Tratamiento con cloroquina de plaquetas y granulocitos

Para el tratamiento con cloroquina, las plaquetas deberían ser preparadas a partir de sangre fresca o sangre conservada durante una noche a 4 °C; los granulocitos son útiles sólo si se preparan inmediatamente[79,101]. Una consideración importante es la extensión del daño de la membrana celular inducido por la cloroquina, que es mínima con células recientes.

1. Las células se preparan como ya se describió. Dos tercios de las células son tratados con cloroquina; el tercio restante no se trata. Después del lavado, y antes de la fijación con PFA, el botón celular es incubado con 4–5 ml de difosfato de cloroquina en PBS (200 mg/ml, pH ajustado a 5,0 con NaOH 1 mol/l) durante 2 h a temperatura ambiente con mezclado ocasional, o tras una noche a 4 °C sin mezclar, si esta estrategia resulta más adecuada para el laboratorio.
2. Lavar tres veces en el tampón apropiado y fijar en PFA al 1% como se describió previamente. El agrupamiento de las células durante el lavado puede ser un problema después del tratamiento con cloroquina, especialmente con granulocitos; los agregados celulares deberían dispersarse por aspiración cuidadosa repetida con pipeta Pasteur. La suspensión celular final para las pruebas serológicas debería prepararse como se describió previamente.

Cuando se leen las pruebas con el microscopio de fluorescencia, es importante reconocer y tener en cuenta cualquier fluorescencia debida al daño celular inducido por cloroquina, que es más probable con los granulocitos que con las plaquetas. Las células dañadas se reconocen fácilmente por su brillante fluorescencia homogénea. Estas células deberían ser excluidas de la evaluación, y sólo deberían considerarse positivas las células que muestren obvia fluorescencia punteada.

Las células tratadas con cloroquina inicialmente se valoraban con el método de fluorescencia de antiglobulinas fluorescentes, pero también pueden usarse en métodos enzimáticos y con antígenos marcados con isótopos.

Interpretación de los resultados de las células tratadas con cloroquina

Los resultados típicos con anticuerpos HLA y anticuerpos específicos de célula se muestran en la tabla 19.19. Si un suero que ha demostrado contener anticuerpos anti-HLA mediante LCT y/o LIFT da reacciones iguales o más fuertes con las células tratadas con cloroquina que con las células no tratadas, ello indica que un anticuerpo específico de célula está también presente. El Second Canadian Workshop on Platelet Serology[97] concluyó que una reacción más débil con plaquetas tratadas con cloroquina debería ser interpretada con cautela; esto podría indicar reactividad HLA residual, especialmente ante la presencia de títulos elevados de anticuerpos HLA multiespecíficos. Pero, si todavía se sospecha la presencia de un anticuerpo plaquetario específico, deberían emplearse otros métodos para confirmarlo (p. ej., MAIPA empleando apropiados anticuerpos monoclonales para captarlo; v. más adelante).

Deberían adoptarse precauciones similares en la interpretación de los resultados del GIFT con las células tratadas con cloroquina.

Análisis MAIPA

El principio del análisis MAIPA se muestra en la figura 19.6. La prueba está basada en el uso de anticuerpos monoclonales, tales como anti-IIb/IIIa, anti-Ib/IX, anti-Ia/IIa y anti-HLA de clase I, para «captar» glucoproteínas específicas de la membrana plaquetaria. La disponibilidad de anticuerpos monoclonales apropiados ha conducido a una aplicación clíni-

Tabla 19.19. Reacciones de los anticuerpos antiplaquetas y antigranulocitos empleando células con y sin tratamiento con cloroquina

Sueros	Células no tratadas		Células tratadas con cloroquina	
	Plaquetas	Granulocitos	Plaquetas	Granulocitos
Negativa	–	–	–	–
Anticuerpos HLA multiespecíficos	+++	++	–	–
Anticuerpos específicos de granulocitos	–	++	–	+++
Anticuerpos específicos de plaquetas	+++	–	+++	–

HLA, antígeno leucocitario humano.

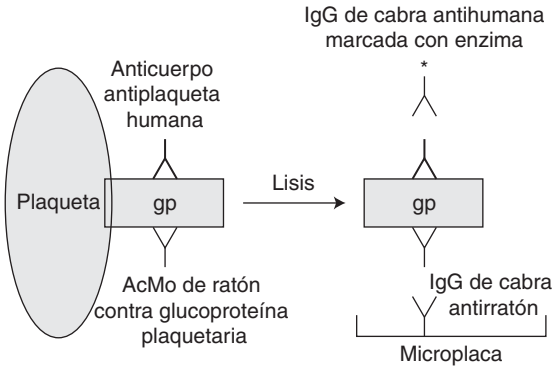


Figura 19.6. Inmovilización con anticuerpos monoclonales de los antígenos plaquetarios (MAIPA): principio del método. AcMo, anticuerpo monoclonal; gp, glucoproteína de membrana plaquetaria.

ca más amplia de este método[78]. El mismo principio puede usarse con los granulocitos, dependiendo de la disponibilidad de anticuerpos monoclonales apropiados[78,102].

El siguiente protocolo de análisis se desarrolló del método original descrito por Kiefel[78,103].

1. Preparar plaquetas como para la PIFT (v. pág. 439), omitiendo la fijación con paraformaldehído.
2. Resuspender un botón de 50-100 × 10^6 plaquetas en 30 µl del suero humano o plasma que debe analizarse e incubar a 37 °C durante 30 min en una microplaca con pocillos en U.
3. Lavar las plaquetas dos veces en tampón PBS/EDTA (8,37 g de Na_2-EDTA en 2,5 l de tampón fosfato solución salina [v. pág. 589]). Resuspender las plaquetas en 30 µl de anticuerpos monoclonales de ratón (anti-Gp IIb/IIIa, Ia/IIa, Ib/IX o HLA a 20 µg/ml) e incubar a 37 °C durante 30 min.
4. Lavar dos veces las plaquetas en tampón PBS/EDTA, lisar por la adición de 100 µl de solución salina tamponada con Tris (TBS) que contenga Nonidet P-40 al 0,5% y dejar a 4 °C durante 30 min.
5. Transferir las plaquetas lisadas a un tubo cónico de 2 ml y centrifugar a 11.600 g durante 30 min a 4 °C para retirar las partículas.
6 Diluir 60 µl del sobrenadante resultante con 180 µl de tampón de lavado TBS (Nonidet P-40 al 0,5%, Tween 20 al 0,05% y $CaCl_2$ 0,5 mmol). Transferir 100 µl de plaquetas lisadas diluidas, por duplicado, a una microplaca con pocillos planos previamente cubiertos con IgG de cabra antirratón[e]. Dejar a 4 °C durante 90 min.
7. Lavar los pocillos de la microplaca cuatro veces con 200 µl de tampón de lavado TBS y seguidamente añadir 100 µl de IgG antihumana marcada con fosfatasa alcalina (Jackson, código 109-055-008) diluido a 1:4.000 en tampón de lavado TBS.

   Mantener a 4 °C durante otros 90 min y a continuación lavar los pocillos cuatro veces con tampón de lavado TBS y añadir 100 µl de solución de sustrato a cada pocillo (p-nitrofenil fosfato a 1 mg/ml en tampón dietanolamina, pH 9,8).
8. Medir el cambio de color resultante a los 30 min usando un espectrofotómetro de longitud de onda dual (p. ej., Bio-Rad modelo 450).

Expresar los resultados como la media de absorbancia a 405 nm de las pruebas duplicadas, menos la media de ocho blancos que contengan tampón de lavado TBS en lugar de lisado plaquetario.

Usar suero AB de un grupo de muestras como control negativo.

Otros métodos

Se han desarrollado varios métodos distintos a los previamente descritos para detectar anticuerpos plaquetarios. Las *técnicas de adherencia de eritrocitos en fase sólida* (SPRCA), algunas de las cuales se encuentran disponibles comercialmente, evolucionaron como alternativa a la lectura microscópica inicialmente requerida para la PIFT. Estos análisis combinan la tecnología tradicional de la serología de los eritrocitos con la serología plaquetaria. Las plaquetas son capturadas en pocillos de microtitulación; se aplican los anticuerpos; y después de lavado y adición de globulina antihumana, se detectan los aloanticuerpos ligados contra antígenos de las plaquetas o contra antígenos HLA usando eritrocitos de cordero tratados con ácido tánico[104] o eritrocitos RhD positivos sensibilizados con anti-D[105]. Las SPRCA son pruebas rigurosas y sensibles que se prestan a la automatización y el tratamiento de las plaquetas con cloroquina puede emplearse eficazmente para filtrar los anticuerpos HLA.

El *GTI PakPlus* es un conjunto de anticuerpos plaquetarios basado en el principio del ELISA[f]. Los micropocillos cubiertos con glucoproteínas plaquetarias o antígenos HLA clase I se incuban con el suero problema. Tras la incubación, seguida de lavado para eliminar las proteínas no fijadas, cualquier anticuerpo fijado al micropocillo es detectado usando reactivos de globulina antihumana conjugada con fosfatasa alcalina (anti-GAM o anti-IgG) y el sustrato apropiado. Los resultados se consideran positivos cuando el cociente entre la proporción de la absorbancia media de la muestra problema y la del suero control normal sea igual o superior a 2,0[106].

Con respecto a las pruebas de anticuerpos antigranulocitos, cuando se trabaja con el GIFT o GAT, la identificación de los aloanticuerpos requiere paneles de granulocitos tipados, que no pueden preservarse más que unas pocas horas.

[e] La microplaca se prepara por la adición a cada pocillo de 100 µl de IgG de cabra antirratón (Sera-Lab, código SBA 1030-01) a 3 µg/ml en una capa de tampón carbonato, pH 9,6. Dejar la placa reposar por la noche a 4 °C. A la mañana siguiente, lavar la placa cuatro veces con tampón de lavado TBS. Dejar el último lavado sobrenadando durante 30 min para «bloquear» la adsorción de proteínas no específicas al plástico y seguidamente decantar.

[f] Quest Biomedical, Solihull B90 2EL, Reino Unido.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Se ha descrito una técnica que usa extractos de antígenos de granulocitos que recubren pocillos en U de placas de Terasaki y una prueba de hemaglutinación pasiva microsurtida. El suero del paciente y los controles apropiados (sueros que contengan anticuerpos específicos de los granulocitos, anticuerpos monoclonales, tales como anti-CD16 y anti-NA1 y suero de donantes normales) se añaden a los pocillos y, tras incubación y lavado, se añaden indicadores de eritrocitos (eritrocitos de cordero recubiertos con IgG antihumana y antirratón). Si se consolida a gran escala, esta técnica, junto con la caracterización molecular de los antígenos, podría hacer que la inmunología de los granulocitos estuviese más fácilmente disponible en los laboratorios de referencia[107].

Determinación del genotipo molecular de los aloantígenos plaquetarios

La aplicación de la tecnología del ADN a la determinación del genotipo de las plaquetas se basa en el conocimiento de que los sistemas antigénicos plaquetarios son el resultado de un cambio único de bases en el ADN, lo que conduce a un polimorfismo de un único aminoácido en las glucoproteínas de la membrana plaquetaria (v. tabla 19.13).

La determinación del genotipo molecular comporta la amplificación de los segmentos relevantes del ADN genómico de cualquier célula nucleada mediante PCR en combinación con cebadores con secuencias específicas[108] o por análisis con enzimas de restricción específicas de los alelos[109] o hibridación *dot blot* de alelos específicos de oligonucleótidos[110].

De la variedad de las técnicas disponibles basadas en la PCR, la PCR con cebadores específicos de secuencia (PCR-SSP) es la más ampliamente usada en el Reino Unido[111] para la determinación de HPA 1 a 5. Actualmente, se acepta que la determinación molecular del genotipo es una parte esencial de la confirmación de la especificidad asignada a los aloanticuerpos plaquetarios, además de permitir la investigación de pacientes con trombocitopenia grave haciendo posible la determinación del genotipo de las plaquetas fetales al inicio del embarazo para evaluar el riesgo de trombocitopenia aloinmune.

BIBLIOGRAFÍA

1. Daniels GL, Anstee DJ, Cartron JP 1995 Blood group terminology 1995: From the ISBT Working Party on Terminology for Red Cell Surface Antigens. Vox Sanguinis 69:265–279.
2. Daniels GL, Anstee DJ, Cartron JP 1999 Terminology for red cell surface antigens. Vox Sanguinis 77:52–57.
3. Cartron JP, Bailly P, Le Van Kim C 1998 Insights into the structure and function of membrane polypeptides carrying blood group antigens. Vox Sanguinis 74 (Suppl. 2):29–64.
4. Daniels G 1999 Functional aspects of red cell antigens. Blood Reviews 13:14–35.
5. Eastlund T 1998 The histo-blood group ABO system and tissue transplantation. Transfusion 38:975–988.
6. Mourant AE, Kopec AC, Domaniewska-Sobczak K 1976 The distribution of the human blood groups and other biochemical polymorphisms, 2nd ed. Oxford University Press, Oxford.
7. Yamamoto F 1995 Molecular genetics of the ABO histo-blood group system. Vox Sanguinis 69:1–7.
8. Garratty G, Arndt P, Co S 1993 Fatal ABO haemolytic transfusion reaction resulting from acquired B antigen only detectable by some monoclonal grouping reagents. Transfusion 33 (Suppl. 47S).
9. Garratty G 1996 Association of blood groups and disease: do blood group antigens and antibodies have a biological role? History and Philosophy of the Life Sciences 18:321-344.
10. O'Donnell J, Laffan M 2001 The relationship between ABO histo-blood group, factor VIII and von Willebrand factor. Transfusion Medicine 11:343–351
11. O'Donnell J, Boulton FE, Manning RA, et al 2002 The amount of H antigen expressed on circulating vWF is modified by ABO blood group genotype and is a major determinant of plasma vWF:Ag levels. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology 22:335–341
12. Cartron JP, Agre P 1993 Rh blood group antigens: protein and gene structure. Seminars in Hematology 30:193–208.
13. Huang CH 1997 Molecular insights into the Rh protein family and associated antigens. Current Opinion in Haematology 4:94–103.
14. Avent ND, Reid ME 2000 The Rh blood group system: a review. Blood 95:375–387.
15. World Health Organization (WHO) 1977 Twenty-eighth Report of WHO Expert Committee on Biological Standardization. Technical Report Series 610. WHO, Geneva.
16. Lo YM, Bowell PJ, Selinger M et al 1994 Prenatal determination of fetal rhesus D status by DNA amplification of peripheral blood of rhesus–negative mothers. Annals of the New York Academy of Sciences 731:229–236.
17. Sazama K 1990 Reports of 355 transfusion-associated deaths: 1976 through 1985. Transfusion 30:583–590.
18. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M 1997 Blood transfusion in clinical medicine, 10th ed. Blackwell Scientific, Oxford, p. 89.
19. Engelfriet CP 1992 The immune destruction of red cells. Transfusion Medicine 2:1–6.
20. Horsewood P, Kelton JG 1994 Macrophage-mediated cell destruction. In: Garratty G (ed) Immunobiology of transfusion medicine. Marcel Dekker, New York, p. 434–464.
21. Zupanska BA 1994 Cellular bioassays and their use in predicting the clinical significance of antibodies. In: Garratty G (ed) Immunobiology of transfusion medicine. Marcel Dekker, New York, p. 465–492.
22. Guyre PM, Miller R 1983 Recombinant immune interferon increases immunoglobulin G Fc receptors on cultured human mononuclear phagocytes. Journal of Clinical Investigation 72:393–397.
23. Griffin JA, Griffin FM 1979 Augmentation of macrophage complement receptor function in vitro. Journal of Experimental Medicine 150:653–675.
24. Volk HD, Reinke P, Krausch D 1996 Monocyte deactivation–rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. Intensive Care Medicine 22:S474–S481.
25. In-vitro diagnostics IVD Medical Devices Directive 1998 Official Journal of the European Communities (7.12.98) 1331.

26. British Committee for Standards in Haematology 1996 Guidelines for pre-transfusion compatibility testing in blood transfusion laboratories. Transfusion Medicine 6:273–283.
27. British Committee for Standards in Haematology 2004 Guidelines for compatibility procedures in blood transfusion laboratories. Transfusion Medicine 14:59–73
28. Case J, Ford DS, Chung A 1999 International reference reagents: antihuman globulin. Vox Sanguinis 77:121–127.
29. Department of Health 1998 Guidelines for the blood transfusion services in the United Kingdom, 4th ed. HMSO, London.
30. British Committee for Standards in Haematology 1995 Recommendations for the evaluation, validation and implementation of new techniques for blood grouping antibody screening and crossmatching. Transfusion Medicine 5: 145–150.
31. Voak D 1992 Validation of new technology for antibody detection by antiglobulin tests. Transfusion Medicine 2: 177–179.
32. Phillips PK, Voak D, Whitton CM, et al 1993 BCSH–NIBSC anti-D reference reagent for antiglobulin tests: the in-house assessment of red cell washing centrifuges and of operator variability in the detection of weak macroscopic agglutination. Transfusion Medicine 3:143–148.
33. Voak D, Downie DM, Moore BPL 1988 Replicate tests for the detection and correction of errors in anti-human globulin AHG tests: optimum conditions and quality control. Haematologia 2:3–16.
34. Knowles SM, Milkins CE, Chapman JF, Scott M 2002 The United kingdom National External Quality Assessment Scheme (Blood Transfusion Laboratory practice): trends in proficiency and practice between 1985 and 2000 Transfusion Medicine 12:11–23.
35. Voak D, Downie DM, Haigh T, Cook N 1982 Improved antiglobulin tests to detect difficult antibodies: detection of anti-Kell by LISS. Medical Laboratory Sciences 39:363–370.
36. Scott ML, Voak D, Phillips P 1994 Review of the problems involved in using enzymes in blood group serology – provision of freeze-dried ICSH/ISBT protease enzyme and anti-D reference standards. Vox Sanguinis 67:89–98.
37. Scott ML, Voak D, Downie DM 1988 Optimum enzyme activity in blood grouping and a new technique for antibody detection: an explanation for the poor performance of the one-stage mix technique. Medical Laboratory Sciences 45:7–18.
38. Scott ML, Phillips PK 1987 A sensitive two-stage papain technique without cell washing. Vox Sanguinis 52:67–70.
39. Pirofsky B 1959 The use of bromelin in establishing a standard cross–match. American Journal of Clinical Pathology 32:350–356.
40. British Committee for Standards in Haematology 1991 Standard haematology practice (Roberts B, ed.) Blackwell Scientific, Oxford, p. 150–163.
41. Coombs RRA, Mourant AE, Race RR 1945 A new test of the detection of weak and "incomplete" Rh agglutinins. British Journal of Experimental Pathology 26:255–266.
42. Voak D, Downie DM, Moore PBL, et al 1986 Anti-human globulin reagent specification: the European and ISBT/ICSH view. Biotest Bulletin 1:7.
43. Engelfriet CP, Overbeeke MAM, Voak D 1987 The antiglobulin test, Coombs test and the red cell. In: Cash JD (ed) Progress in transfusion medicine. Churchill Livingstone, Edinburgh, vol 2, p. 74–98.
44. Sinor LT 1992 Advances in solid-phase red cell adherence methods and transfusion serology. Transfusion Medicine Reviews 6:26–31.
45. Lapierre Y, Rigel D, Adams J, et al 1990 The gel test: a new way to detect red cell antigen– antibody reactions. Transfusion 30:109–113.
46. Phillips P, Voak D, Downie M 1998 New reference reagent for the quality assurance of anti-D antibody detection. Transfusion Medicine 8:225–230.
47. O'Hagan J, Milkins CE, Chapman JF, et al 1997 Antibody titres – results of a UK NEQAS BGS exercise and accompanying questionnaire. Transfusion Medicine 7:Suppl. 1.
48. British Committee for Standards in Haematology 1999 Addendum for guidelines for blood grouping and red cell antibody testing during pregnancy. Transfusion Medicine 9:99.
49. Santoso S 1998 Human platelet-specific alloantigens: update. Vox Sanguinis 74 (Suppl. 2):249–253.
50. Bux J, von dem Borne AEG, de Haas L 1999 ISBT Working Party on Platelet and Granulocyte Serology, Granulocyte Antigen Working Party: Nomenclature of granulocyte alloantigens. Vox Sanguinis 77:251.
51. Lucas GF, Metcalfe P 2000 Platelet and granulocyte polymorphisms. Transfusion Medicine 10:157–174.
52. Decary F, L'Abbe D, Tremblay L, et al 1991 The immune response to the HPA-1a antigen: association with HLA-DRw52a. Transfusion Medicine 1:55–62.
53. Williamson LW, Hackett G, Rennie J, et al 1998 The natural history of fetomaternal alloimmunization to the platelet-specific antigen HPA-1a PI^{A1} Zw^{a} as determined by antenatal screening. Blood 92:2280–2287.
54. Flug F, Karpatkin M, Karpatkin S 1994 Should all pregnant women be tested for their platelet PLA Zw HPA-1 phenotype? British Journal of Haematology 86:1–5.
55. Mueller-Eckhardt C, Kroll H, Kiefel V, et al 1991 European PTP Study Group: Post-transfusion purpura. Platelet immunology: fundamental and clinical aspects. (Kaplan-Gouet C, Schlegel N, Salmon C, McGregor J, eds.) INSERM/John Libbey Eurotext.
56. Schnaidt M, Northoff H, Wernet D 1996 Frequency and specificity of platelet-specific allo-antibodies in HLA-immunised haematologic-oncologic patients. Transfusion Medicine 6:111–114.
57. Kurz M, Hildegard G, Hocker P, et al 1996 Specificities of anti-platelet antibodies in multitransfused patients with haemato-oncological disorders. British Journal of Haematology 95:564–569.
58. Bierling P, Fromont P, Elbez A, et al 1988 Early immunization against platelet glycoprotein IIIa in a new born Glanzmann type I patient. Vox Sanguinis 55:109–113.
59. Brown CH 3rd, Weisberg RJ, Natelson EA, et al 1975 Glanzmann's thrombasthenia: assessment of the response to platelet transfusion. Transfusion 15:124–131.
60. Ribera A, Martin-Vega C, Pico M, et al 1988 Sensitization against platelet antigens in Glanzmann disease. Abstract XX, Congress of the International Society of Blood Transfusion in Association with British Blood Transfusion Society (BBTS), Manchester, p. 240.
61. Van Leeuwen EF, von dem Borne AEGKr, Von Riesz LE, et al 1981 Absence of platelet specific alloantigens in Glanzmann's thrombasthenia. Blood 57:49–54.
62. Degos L, Tobelem G, Lethielliux P, et al 1977 A molecular defect in platelets of patients with Bernard–Soulier syndrome. Blood 50:899–903.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

63. Van Leeuwen EF, Helmerhorst FM, Engelfriet CP, et al 1982 Specificity of auto-antibodies in autoimmune thrombocytopenia. Blood 59:23–26.
64. Fujisawa K, Tani P, O'Toole TE, et al 1992 Different specificities of platelet-associated and plasma auto-antibodies to platelet GPIIb–IIIa in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. Blood 79:1441–1446.
65. Fujisawa K, Tani P, McMillan R 1993 Platelet-associated antibody to glycoprotein IIb/IIIa from chronic immune thrombocytopenic purpura patients often binds to divalent cation-dependent antigens. Blood 81:1284–1289.
66. Hou M, Stockelberg D, Kutti J, et al 1995 Glycoprotein IIb/IIIa autoantigenic repertoire in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. British Journal of Haematology 91:971–975.
67. Kelton JG, Sheridan DP, Santos AV, et al 1988 Heparin-induced thrombocytopenia: laboratory studies. Blood 72: 925–930.
68. Pegels JG, Bruynes ECE, Engelfriet CP, et al 1982 Pseudothrombocytopenia: an immunologic study on platelet antibodies dependent on ethylene diamine tetra-acetate. Blood 59:157–161.
69. Shastri KA, Logue GL 1993 Autoimmune neutropenia. Blood 81:1984–1995.
70. McCullough J, Clay ME, Thompson HW 1987 Autoimmune granulocytopenia. Baillière's Clinical Immunology and Allergy 1:303.
71. Bux J, Mueller-Eckhardt C 1992 Autoimmune neutropenia. Seminars in Hematology 29:45–53.
72. Mueller-Eckhardt C 1987 Drug-induced immune thrombocytopenia. Baillière's Clinical Immunology and Allergy 1:369.
73. Mueller-Eckhardt C, Salama A 1990 Drug-induced immune cytopenias: a unifying pathogenetic concept with special emphasis on the role of drug metabolites. Transfusion Medicine Reviews 4:69–77.
74. Salama A, Schutz B, Kiefel V, et al 1989 Immune-mediated agranulocytosis related to drugs and their metabolites: mode of sensitization and heterogeneity of antibodies. British Journal of Haematology 72:127–132.
75. Minchinton RM 2000 What can we learn from National and International Platelet Serology Workshops? Transfusion Medicine Reviews 14:74–83.
76. Metcalfe P, Waters AH 1990 Report on the fourth ISBT/ICSH platelet serology workshop. Vox Sanguinis 58:170–175.
77. Von dem Borne AE, Verheught FW, Oosterhof F, et al 1978 A simple immunofluorescence test for the detection of platelet antibodies. British Journal of Haematology 39: 195–207.
78. Kiefel V 1992 The MAIPA assay and its applications in immunohaematology. Transfusion Medicine 2:181–188.
79. Nordhagen R, Flaathen ST 1985 Chloroquine removal of HLA antigens from platelets for the platelet immunofluorescence test. Vox Sanguinis 48:156–159.
80. von dem Borne AEGKr, van der Lelie J, Vos JJE, et al 1986 Antibodies against crypt antigens of platelets. Characterisation and significance for the serologist. Current Studies in Hematology and Blood Transfusion 52:33. Karger, Basel.
81. Bux J, Kober B, Kiefel V, et al 1993 Analysis of granulocyte-reactive antibodies using an immunoassay based upon monoclonal-antibody-specific immobilization of granulocyte antigens. Transfusion Medicine 3:157–162.
82. Minchinton RM, Noonan K, Johnson TJ 1997 Examining technical aspects of the monoclonal antibody immobilization of granulocyte antigen assay. Vox Sanguinis 73: 87–92.
83. Shulman NR, Leissinger CA, Hotchkiss AJ, et al 1982 The non-specific nature of platelet associated IgG. Transactions of the Association of American Physicians 95:213–220.
84. Von dem Borne AEGKr 1987 Autoimmune thrombocytopenia. Baillière's Clinical Immunology and Allergy 1: 269.
85. Goodall AH, Macey MG 1994 Platelet-associated molecules and immunoglobulins. In: Macey MR (ed) Flow cytometry—clinical applications. Blackwell Scientific, London, p. 148–191.
86. Ault KA 1988 Flow cytometric measurement of platelet-associated immunoglobulin. Pathology and Immunopathology Research 7:395–408.
87. Von dem Borne AE, Vos JJ, van der Lelie J, et al 1986 Clinical significance of positive platelet immunofluorescence test in thrombocytopenia. British Journal of Haematology 64:767–776.
88. Verheugt FWA, von dem Borne AEGKr, Decary F, et al 1977 The detection of granulocyte allo-antibodies with an indirect immunofluorescence test. British Journal of Haematology 36:533–544.
89. McCullough J, Clay ME, Press C, et al 1988 Granulocyte serology. A clinical and laboratory guide. ACSP, Chicago.
90. Lucas GF 1994 Prospective evaluation of the chemiluminescence test for the detection of granulocyte antibodies: comparison with the immunofluorescence test. Vox Sanguinis 66:141–147.
91. Bux J 1996 Challenges in the determination of clinically significant granulocyte antibodies and antigens. Transfusion Medicine Reviews 10:222–232.
92. Stroncek DF 1997 Granulocyte immunology: is there a need to know? Transfusion 37:886–888.
93. Claas FHJ, Langerak J, de Beer LL, et al 1981 Drug-induced antibodies: interaction of the drug with a polymorphic platelet antigen. Tissue Antigens 17:64–66.
94. Salama A, Mueller-Eckhardt C, Kissel K, et al 1984 Ex vivo antigen preparation for the serological detection of drug-dependent antibodies in immune haemolytic anaemias. British Journal of Haematology 58:525–531.
95. Decary F, Vermeulen A, Engelfriet CP 1975 A look at HLA antisera in the indirect immunofluorescence technique LIFT. In: Histocompatibility testing. Munksgaard, Copenhagen, p. 380.
96. Metcalfe P, Minchinton RM, Murphy MF, et al 1985 Use of chloroquine-treated granulocytes and platelets in the diagnosis of immune cytopenias. Vox Sanguinis 49: 340–345.
97. Decary F 1988 Report on the second Canadian workshop on platelet serology. Current Studies in Hematology and Blood Transfusion 54:1. Karger, Basel.
98. Helmerhorst FM, Ten Boerge ML, van der Plas–van Dalen C, et al 1984 Platelet freezing for serological purposes with and without a cryopreservative. Vox Sanguinis 46: 318–322.
99. Helmerhorst FM, van Oss CJ, Bruynes ECE, et al 1982 Elution of granulocyte and platelet antibodies. Vox Sanguinis 43:196–204.
100. Vos JJE, Huisman JG, Winkel IN, et al 1987 Quantification of platelet-bound allo-antibodies by radioimmunoassay: a study on some variables. Vox Sanguinis 53:108–116.

101. Minchinton RM, Waters AH 1984 Chloroquine stripping of HLA antigens from neutrophils without removal of neutrophil specific antigens. British Journal of Haematology 57:703–706.
102. Metcalfe P, Waters AH 1992 Location of the granulocyte-specific antigen LAN on the Fc-receptor III. Transfusion Medicine 2:283–287.
103. Kiefel V, Santoso S, Weisheit M, et al 1987 Monoclonal antibody specific immobilization of platelet antigens MAIPA: a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. Blood 70:1722–1726.
104. Shibata Y, Juji T, Nishizawa Y, et al 1981 Detection of platelet antibodies by a newly developed mixed agglutination with platelets. Vox Sanguinis 41:25–31.
105. Lown JA, Ivey JG 1991 Evaluation of solid phase red cell adherence technique for platelet antibody screening. Transfusion Medicine 1:163–167.
106. Lucas GF, Rogers SE 1999 Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay kit GTI PakPlus® for the detection of antibodies against human platelet antigens. Transfusion Medicine 9:63–67.
107. Araki N, Nose Y, Kohsaki M, et al 1999 Anti-granulocyte antibody screening with extracted granulocyte antigens by a micro-mixed passive haemagglutination method. Vox Sanguinis 77:44–51.
108. Metcalfe P, Waters AH 1993 HPA-1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers PCR-SSP: a rapid and simple technique. British Journal of Haematology 85:227–229.
109. Simsek S, Faber NM, Bleeker PM, et al 1993 Determination of human platelet antigen frequencies in the Dutch population by immunophenotyping and DNA allele-specific restriction enzyme analysis. Blood 81:835–840.
110. McFarland JG, Aster RH, Bussel JB, et al 1991 Prenatal diagnosis of neonatal alloimmune thrombocytopenia using allele-specific oligonucleotide probes. Blood 78: 2276–2282.
111. Cavanagh G, Dunn A, Chapman CE, et al 1997 HPA genotyping by PCR sequence specific priming PCR-SSP: a streamlined method for rapid routine investigations. Transfusion Medicine 7:41–45.
112. Engelfriet CP, Tetteroo PAT, van der Veen JPW et al 1984 Granulocyte-specific antigens and methods for their detection. In: McCullough J, Sandler SG, Sweeney GE (eds) Advances in Immunobiology: blood cell antigens and bone marrow transplantation. Liss, New York, p. 121.
113. McCullough J 1985 The clinical significance of granulocyte antibodies and in vivo studies of the fate of granulocytes. In: Garraty G (ed) Current Concepts in Transfusion Therapy. American Association of Blood Banks, Arlington, VA, p. 125.
114. Minchinton RM, Waters AH 1984 The occurrence and significance of neutrophil antibodies. British Journal of Haematology 56:521–528.
115. Lo YM, Tein MS, Lau TK, et al 1998 Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. American Journal of Human Genetics 62:768–775.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

20 Aspectos de laboratorio de las transfusiones sanguíneas

Megan Rowley y Clare Milkins

Progresos recientes en las transfusiones sanguíneas 450
Sistemas de compatibilidad pretransfusionales 450
Identificación y almacenaje de muestras de sangre 451
Documentación del proceso de transfusión 452
Determinación de los grupos ABO y D 452
Determinación del grupo ABO 452
Determinación del grupo D 453
Detección de anticuerpos 457
Panel de hematíes 457
Técnicas de antiglobulina indirecta 458
Identificación de anticuerpos 459
Determinación del fenotipo 459
Paneles y técnicas adicionales 459
Selección y transfusión de eritrocitos 460
Pruebas cruzadas 461
Elección de la técnica 461
Transfusiones urgentes 463
Determinación rápida del grupo ABO y D 463
Transfusión masiva 463
Serología prenatal y enfermedad hemolítica del recién nacido 464
Enfermedad hemolítica del recién nacido 464
Serología prenatal 464
Predicción del grupo sanguíneo fetal 465
Valoración prenatal de la gravedad de la enfermedad hemolítica del recién nacido 465
Enfermedad hemolítica ABO del recién nacido 468
Pruebas de compatibilidad en situaciones transfusionales especiales 469
Neonatos y niños en los primeros 4 meses de vida 469
Transfusiones intrauterinas (fetales) 469
Pacientes que reciben transfusiones a intervalos cortos 470
Trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas 470
Estudio de una reacción transfusional 471
Reacciones transfusionales agudas 471
Reacciones transfusionales hemolíticas retardadas 473

Las transfusiones sanguíneas seguras y efectivas requieren la combinación de los esfuerzos de los centros de transfusiones sanguíneas, de científicos y de clínicos, para asegurar la aplicación de la mejor calidad a todos los sistemas de un complejo proceso de «vena a vena». Este capítulo proporciona una descripción de la estructura de laboratorio que se requiere para proporcionar los productos sanguíneos adecuados, al paciente adecuado y en el momento adecuado. La creciente concienciación de que puede haber problemas proviene de varias fuentes incluyendo el plan de hemovigilancia de riesgos graves de las transfusiones del Reino Unido, que se inició en 1996[1,2]. Este plan de informes confidenciales, que se sirve de un detallado análisis de errores, ha proporcionado datos que han permitido a los organismos nacionales y centros de transfusión locales introducir medidas para reducir el riesgo. Está claro que pueden ocurrir múltiples errores y que muchos de ellos no pueden ser controlados por el centro de transfusión (figs. 20.1 y 20.2). En el seno del centro debería llevarse a cabo la aplicación de protocolos estrictos para el etiquetado y análisis, empleo de procedimientos de laboratorio rigurosos y documentación fiable, y frecuente formación del personal.

Este capítulo versa sobre el estudio de las muestras de los pacientes previo a la administración de los productos san-

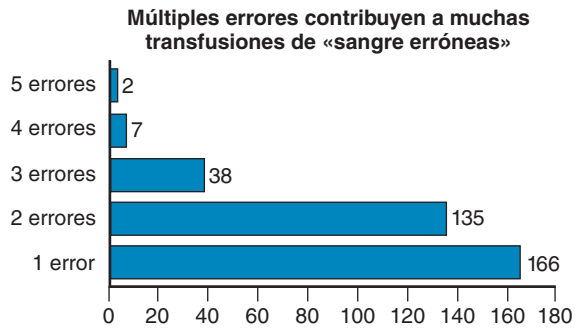


Figura 20.1. Datos del SHOT *(Serious Hazards of Transfusion)* 2003[1,2] que muestran que en 348 casos analizados en los que se transfundió sangre errónea, ocurrieron múltiples errores en el 52% de los casos.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

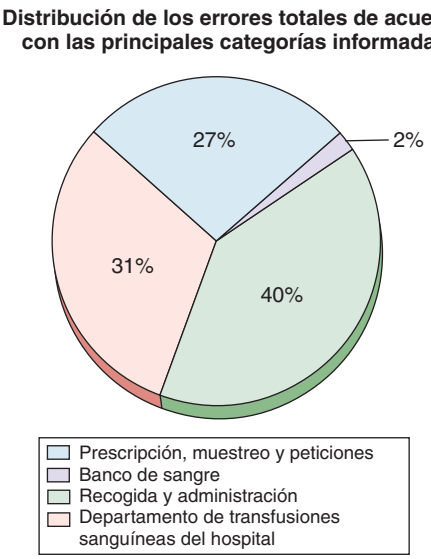


Figura 20.2. Datos del SHOT *(Serious Hazards of Transfusion)* 2003[1,2] que muestran la distribución de errores de acuerdo con las principales categorías informadas, de un total de 588 errores del análisis de 348 informes completos.

guíneos compatibles, incluyendo la identificación de los anticuerpos de los eritrocitos. También incluye las pruebas de compatibilidad y el estudio de las reacciones transfusionales y las pruebas que se requieren en otras situaciones especiales incluyendo las transfusiones prenatales y posnatales. Los organismos profesionales nacionales, como el British Committee for Standards in Haematology (BCSH)[3] y el AABB[4] (inicialmente la American Association of Blood Banks), emiten guías para los centros de transfusión y se hará referencia a las mismas cuando sea apropiado. La Directiva Europea de la Sangre (Directiva 2002/98/EC) se convierte en ley en los países miembros en 2005; esto tiene importantes implicaciones para la práctica de transfusiones en los hospitales, particularmente en los términos de seguimiento de «vena a vena» de los productos sanguíneos, la necesidad de registros de almacenaje de las transfusiones durante 30 años y el requisito de un sistema de control de calidad[5]. El gobierno del Reino Unido continúa promoviendo la transfusión segura y eficaz de los productos sanguíneos a través de sus dos Health Service Circulars[6,7]. Estos documentos tienen por objetivo que se dé un enfoque colectivo a la seguridad de las transfusiones sanguíneas por medio de acuerdos con las autoridades clínicas y que se promueva la buena práctica transfusional a través de los comités y equipos de transfusión hospitalarios.

PROGRESOS RECIENTES EN LAS TRANSFUSIONES SANGUÍNEAS

Desde la edición previa de este libro, se han producido importantes cambios en los centros de transfusiones sanguíneas. Ahora son habituales las etiquetas con códigos de barra en productos sanguíneos, reactivos, muestras de pacientes y equipos de laboratorio, lo que resulta en una transferencia más segura de la información, libre de los errores de trascripción que se asocian con los métodos manuales.

Las técnicas de aglutinación en columna y en fase sólida (v. cap. 19) pueden emplearse tanto en maquinas automáticas como en técnicas manuales, y en el 80% de los laboratorios de los hospitales del Reino Unido estas tecnologías han reemplazado parcial o totalmente a las técnicas en tubo y microplacas en fase líquida para la detección de anticuerpos[8]. Aunque poseen muchas ventajas, también existen algunas restricciones impuestas por el hecho de que la mayoría de las tarjetas/casetes de uso común en aglutinación en columna tienen seis columnas.

Cada laboratorio individual necesita tomar decisiones sobre la selección de los perfiles y reactivos cuando emplean esta tecnología para la determinación del grupo sanguíneo, y es vital que cualquier prueba abreviada en un sistema automático o semiautomático sea cuidadosamente evaluada por el riesgo que podría resultar si se omitieran controles importantes[9]. Los sistemas informatizados almacenan detalles de los pacientes y resultados de las pruebas de laboratorio, lo que permite acceder a importante información de manera oportuna y precisa.

Muchos interactúan con analizadores automáticos del grupo sanguíneo y algunos usan programas para interpretar los resultados de las pruebas. Los algoritmos informáticos apoyan la «emisión electrónica» de sangre a pacientes con una detección negativa de anticuerpos sin la necesidad de usar una prueba de compatibilidad con antiglobulinas, y en el Reino Unido el 19% de los laboratorios están usando este sistema para algunos o todos sus pacientes[8]. La aplicación y el uso de la automatización para todos los aspectos de las pruebas de compatibilidad continúan aumentando. La automatización incluye en un proceso con un soporte único varios o todos los procesos distintos de las pruebas de compatibilidad. Ello proporciona un aumento marcado en el nivel de seguridad respecto a las pruebas manuales y podría proporcionar justificación para las pruebas abreviadas pretransfusionales (p. ej., el abandono de la detección duplicada del grupo D [previamente llamado «RhD»] o la determinación indirecta del grupo ABO). Antes de cualquier acortamiento de un proceso establecido debe hacerse y documentarse una valoración del riesgo, considerando la presencia o ausencia de funciones clave en el equipo automático. La guía del BCSH para los procedimientos de compatibilidad[9] proporciona una lista de factores que deben tenerse en cuenta; aconsejamos a los lectores su consulta antes de implementar los sistemas automáticos o semiautomáticos.

SISTEMAS DE COMPATIBILIDAD PRETRANSFUSIONALES

El proceso de suministrar sangre para una transfusión conlleva muchos pasos, que tienen que ser completados de forma fiable. Incluyen los siguientes:

1. Las muestras de sangre tienen que ser obtenidas del paciente correcto y etiquetadas a la cabecera de su cama en un procedimiento único e ininterrumpido. La muestra debe ser identificada como mínimo con un nombre y un apellido correctamente deletreados, la fecha exacta de nacimiento y un número de paciente único y preciso. La muestra debería ser fechada y firmada por la persona que la obtiene[9]. Algunas guías recomiendan no aceptar etiquetas impresas automáticamente en las muestras de sangre para las pruebas de compatibilidad. El centro debería tener una política de rechazo de las muestras etiquetadas incorrectamente[10], aunque un reciente estudio en hospitales de Inglaterra y Norte de Gales mostró una considerable variación en el contenido y aplicación de estas políticas[11]. La solicitud de servicios debería incluir los identificadores del paciente previamente expuesto, así como información clara sobre el origen de la petición y la localización del paciente y detalles clínicos incluyendo una detallada justificación para la petición. También son necesarias la historia transfusional previa y cualquier consideración especial para la selección de la sangre (p. ej., prueba de citomegalovirus [CMV] o irradiación).
2. Debe realizarse una determinación precisa de los grupos ABO y D de la muestra del paciente.
3. La detección de anticuerpos en el plasma/suero del paciente (o en el plasma/suero de la madre en el caso de un neonato) debería permitir detectar cualquier anticuerpo antieritrocitario clínicamente significativo. En el caso de una detección positiva de anticuerpos antieritrocitarios, debería procederse a su identificación para facilitar la selección de sangre compatible.
4. Debería verificarse la existencia de registros transfusionales para comparar los resultados actuales e históricos.
5. Deberían seleccionarse los componentes apropiados de la sangre y considerarlos como útiles para la transfusión para un paciente concreto empleando pruebas cruzadas serológicas o validación electrónica.
6. Debería existir documentación de fácil acceso para asegurar que los resultados de los procedimientos de compatibidad de laboratorio están disponibles a la cabecera del paciente para permitir su revisión antes de transfundir el producto sanguíneo. Ello podría incluir una etiqueta de compatibilidad en la bolsa de sangre (fig. 20.3) y un formulario de compatibilidad. Los pacientes deben ser identificados con una pulsera y los productos sanguíneos deben ser prescritos en una hoja de tratamiento o de administración de fluidos[10]. En algunos países se realiza una revisión adicional del grupo sanguíneo del paciente, a la cabecera de la cama, previa al inicio de la transfusión.

Identificación y almacenaje de muestras de sangre

Para las pruebas de las transfusiones sanguíneas, dependiendo de la práctica habitual del centro, podría requerirse una muestra coagulada o sangre anticoagulada con EDTA. Las muestras coaguladas deben introducirse en un tubo seco, *pero no en un tubo con gel separador* (v. cap. 19, pág. 426). Cuando se reciben en el laboratorio, deben revisarse los detalles del formulario de solicitud frente a la muestra de sangre. Cada muestra de sangre debe ser etiquetada con un único número de muestra. Los códigos de barras ofrecen las ventajas de una concluyente identificación de la muestra y reducción de los errores de transcripción. Las muestras etiquetadas inadecuada o erróneamente *no* deberían emplearse para las pruebas pretransfusionales[9]. Debe tenerse gran cuidado en la selección e identificación de la muestra previamente a cualquier prueba. La transposición de las muestras en el laboratorio puede conducir a la asignación a un paciente de un grupo sanguíneo incorrecto, con serias consecuencias, incluyendo transfusiones con incompatibilidad ABO. Si es posible, debe emplearse para las pruebas muestra del tubo primario. Si las muestras se separan, el plasma/suero debe ser identificado de manera clara y precisa y se deben tomar precauciones especiales (fig. 20.4). Si se prevé la realización de pruebas repetidas con la muestra, el almacenaje en pequeñas alícuotas reduce el riesgo de deterioro producido por repetidas descongelaciones/congelaciones de muestras de mayor volumen.

Las muestras de sangre completa deberían analizarse lo antes posible porque se deterioran con el tiempo. Los pro-



Figura 20.3. Unidad de concentrado de eritrocitos con una etiqueta de compatibilidad.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Cuando se use **suero** para la determinación del grupo sanguíneo y las pruebas de incompatibilidad, cualquier **eritrocito** en el sistema de la prueba debería ser lavado y suspendido en solución salina que contenga EDTA. La presencia de complemento en el suero puede causar lisis y por lo tanto podría conducir a mala interpretación de las pruebas basadas en aglutinación. Además, reacciones falsas negativas pueden ocurrir en las pruebas cruzadas de centrifugación inmediata con anticuerpos ABO potentes, cuando la fijación rápida del complemento causa un efecto prozona (la unión de C1 inhibe la aglutinación). La solución salina con EDTA no es necesaria cuando se usa **plasma**.

Figura 20.4. Precauciones que deben tomarse cuando se usa suero en lugar de plasma para la determinación del grupo sanguíneo y las pruebas de compatibilidad.

blemas asociados con el almacenaje incluyen la rotura de los eritrocitos, la pérdida del complemento del suero y el descenso de la potencia de los anticuerpos. La guía del BCSH[9] indica los límites de empleo y se resumen en la tabla 20.1. Si se almacenan muestras separadas de plasma o suero para pruebas cruzadas serológicas posteriores, se debe tener cuidado en asegurar que el paciente no ha sido transfundido en ese intervalo. Se recomienda almacenar las muestras durante 7 días en todos los pacientes que han sido transfundidos para permitir investigar cualquier reacción transfusional subsiguiente[12,13].

Documentación del proceso de transfusión

Todas las etapas del proceso de transfusión deben estar claramente documentadas y las normas actuales de la Unión Europea requieren que los registros deben ser consultables durante 30 años[5]. Esto permite que cualquier producto sanguíneo pueda ser rastreado desde el donante hasta el receptor para aportar información sobre cualquier riesgo infectivo potencial para el receptor. Este sistema se ha evaluado en el estudio retrospectivo de la hepatitis C emprendido por el National Blood Service del Reino Unido[14].

Los registros informáticos son más fáciles de buscar que los registros en papel, pero es probable que los sistemas informáticos queden obsoletos y tengan que ser reemplazados varias veces durante el período obligatorio de 30 años, por lo que se deben tomar precauciones para almacenar los datos históricos en un formato accesible cuando se realice una sustitución del sistema informático[15]. Los registros mantenidos por el paciente son útiles para pacientes tratados en más de una institución, particularmente si tienen anticuerpos antieritrocitarios y requieren sangre con determinación del fenotipo o si tienen requerimientos especiales por su enfermedad subyacente o su tratamiento. Algunos centros transfusionales proporcionan registros del tamaño de una tarjeta de crédito a pacientes con anticuerpos antieritrocitarios, y existen tarjetas similares para pacientes que requieren productos sanguíneos con irradiación celular[16]. En Hong Kong, se ha propuesto un sistema para codificar el fenotipo de los eritrocitos de todos los ciudadanos, de manera que forme parte de la información disponible en la tarjeta de identificación[17].

DETERMINACIÓN DE LOS GRUPOS ABO Y D

La determinación de los grupos ABO y D debe realizarse mediante una técnica validada con controles apropiados. Antes del uso de nuevos lotes de reactivos para determinar el grupo debe comprobarse su fiabilidad con las técnicas empleadas en el laboratorio. Estos reactivos deben almacenarse según las instrucciones del fabricante.

Determinación del grupo ABO

La determinación del grupo ABO es la prueba serológica única más importante realizada en las pruebas de compatibilidad; consecuentemente, es imperativo que la sensibilidad y seguridad del sistema de la prueba sean máximas. El hecho de que los anticuerpos anti-A y anti-B aparezcan de manera natural permite enfrentar el suero/plasma del paciente a células identificadas como A y B en la llamada «prueba sérica».

Esto es una excelente comprobación intrínseca para el grupo «hemático» o celular y se ha considerado siempre una parte integral de la determinación del grupo ABO, permitiendo la división de la lectura y registro de los resultados de la prueba en dos procedimientos diferenciados. Sin embargo, la llegada de sistemas seguros completamente automáticos, unidos a seguros sistemas tecnológicos de información, que combinados permiten evitar errores en el procedimiento de la determinación del grupo ABO, ha hecho que algunos laboratorios actualmente omitan la prueba sérica de estudio del grupo sanguíneo cuando analizan muestras para las que se disponga de una determinación histórica del grupo. Esto sólo debería considerarse tras una cuidadosa valoración del riesgo y teniendo en cuenta que la primera muestra obtenida podría haber sido de un paciente erróneo[9,11], lo que puede suceder en alrededor de 1:2.000 muestras[18]. Debería investigarse cualquier discrepancia entre las pruebas hemática y sérica de la determinación del grupo, y cualquier prueba que se repita debe realizarse a partir de células obtenidas de la muestra original más que de una suspensión ya preparada de células.

Tabla 20.1. Límites recomendados para la conservación de muestras para pruebas de compatibilidad[9]

Muestra	18–25 °C	4 °C	–20 °C
Sangre completa anticoagulada con EDTA	Hasta 48 h	Hasta 7 días	No aplicable
Plasma/suero separado	No aplicable	Hasta 7 días	6 meses

Reactivos para la determinación del grupo ABO

Previamente a la introducción de reactivos monoclonales, tradicionalmente, para las pruebas de determinación del grupo de los eritrocitos se empleaban anticuerpos policlonales anti-A, anti-B y anti-AB. Los reactivos anti-AB (procedentes de suero del grupo O) sirven como comprobación adicional de las células aglutinadas por anti-A y/o anti-B, pero también son capaces de detectar antígenos A de expresión débil (p. ej., A_x). Los reactivos policlonales han sido reemplazados por mejores reactivos monoclonales anti-A y anti-B, y aunque existen reactivos monoclonales anti-AB y anti-A+B, no existe necesidad de incluirlos en las pruebas rutinarias de determinación del grupo sanguíneo. Las células A_1 y B se emplean para la determinación sérica del grupo; pueden incluirse células del grupo O o un autocontrol para asegurar que las reacciones con anti-A y anti-B no se deben a la presencia de anticuerpos fríos.

Determinación del grupo D

La determinación del grupo D se realiza generalmente, al mismo tiempo que la del grupo ABO, por comodidad y para minimizar los errores de trabajo, que podrían aumentar por la manipulación repetida de las muestras del paciente. En ausencia de una automatización segura, las pruebas deberían realizarse por duplicado porque no existe un homólogo de la prueba inversa de determinación del grupo ABO.

Reactivos para la determinación del grupo D

Los reactivos monoclonales no tienen el problema de una posible contaminación con anticuerpos de especificidad no deseada, como ocurría con los agentes policlonales. Por ello, la prueba por duplicado puede realizarse usando el mismo reactivo anti-D, aunque debería ser dispensado como si fueran dos reactivos distintos. El D^{VI} es el D parcial con el menor número de epítopos; por ello los individuos D^{VI} son los que tienen mayor probabilidad de formar anti-D[9,19]. Por esta razón[20], deberían seleccionarse para evaluar muestras de pacientes reactivos monoclonales anti-D que no detecten D^{VI}. El empleo de reactivos anti-CDE ha conducido a mala interpretación de las células r′ y r′′ en los ejercicios del National External Quality Assessment Scheme (NEQAS) del Reino Unido, y dado que no tiene valor en la determinación rutinaria del grupo del paciente, su uso no se recomienda[9]. La selección de reactivos monoclonales anti-D de elevada afinidad permitiría la detección de todos, salvo los tipos más débiles, del D débil, anulando la necesidad de usar técnicas más sensibles para revisar el estatus D de evidentes D negativos.

Algunos reactivos anti-D tienen elevados niveles de potenciador (p. ej., polietilenglicol) y deberían usarse con precaución; es esencial un diluyente control, para demostrar que dicho diluyente no promueve la aglutinación de los eritrocitos analizados, como podría ocurrir si las células del paciente estuvieran cubiertas *in vivo* con inmunoglobulina G (IgG); cualquier positivo observado en el control, aunque sea débil, invalida el resultado de la prueba. Los reactivos anti-D se proporcionan en múltiples equipos diferentes, y los responsables de la selección y compra deberían conocer el contenido, especificidad y potenciación del reactivo escogido.

Métodos

Hay varias técnicas disponibles para la determinación del grupo ABO y D incluyendo tubos, portas, microplacas y columnas. Se han descrito otras técnicas para la determinación del grupo sanguíneo (p. ej., citometría de flujo)[21], pero no se emplean rutinariamente. Se debe tener cuidado en emplear el reactivo apropiado, dado que no todos han sido validados por los fabricantes para todas las técnicas.

Pruebas en tubos y portas

Las pruebas en tubo con centrifugación se usan con frecuencia, especialmente para pruebas urgentes, cuando se efectúa cada vez un pequeño número de pruebas. Las técnicas en portaobjetos o placas son ampliamente usadas para la determinación de los grupos ABO y D en países de escasos recursos. Las pruebas en tubo con centrifugación deberían realizarse en tubos de plástico de 75 × 10 o 75 × 12 mm. La prueba de centrifugación inmediata puede hacerse en casos de emergencia, mientras que en las pruebas rutinarias los tubos se dejan durante 15 min a temperatura ambiente (unos 20 °C) antes de la centrifugación durante 1 min a 150 g. Se utilizan volúmenes iguales (1 o 2 gotas del cuentagotas del reactivo comercial o de una pipeta Pasteur) de reactivo líquido o suero/plasma y suspensiones de células al 2%. Los eritrocitos del paciente (diluidos en un tampón fosfato salino [PBS]) deberían ser enfrentados a reactivos de eritrocitos A1 y B (determinación del grupo inversa). Además, el suero o plasma debería enfrentarse a las propias células del paciente o células del grupo O (es decir, un control negativo), para excluir reacciones con células A y B como resultado de aglutininas frías, distintas a las anti-A o anti-B de la muestra del paciente. Para prevenir la mala interpretación de los resultados obtenidos por la presencia de hemólisis cuando se emplea suero, se recomienda que el diluyente para la resuspensión de las células en la determinación inversa del grupo contenga EDTA (v. más adelante). Se mezcla la suspensión por agitación de los tubos y se mantiene en reposo durante 15 min. La aglutinación debería leerse como se describe en la página 428. Debería evaluarse cualquier discrepancia entre los resultados de la determinación directa del grupo de los eritrocitos y la determinación por la prueba sérica, y para la repetición de cualquier prueba deberían emplearse células obtenidas de la muestra original en vez de las de la suspensión de hematíes ya preparada. La determinación por la prueba sérica no se realiza en niños menores de 4 meses de edad porque aún no se han generado los anticuerpos correspondientes.

EDTA como diluyente

Solución madre. Preparar una solución de EDTA (sal dipotásica) en agua destilada a 0,1 mol/l. Ajustar el pH a 7,0 empleando NaOH a 5 mmol/l.

Solución de trabajo. Mezclar 1 volumen de la solución madre con 9 volúmenes de solución salina o solución sali-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

na de baja fuerza iónica (LISS). Comprobar el pH y ajustar a 7,0 si es necesario.

Método en portaobjeto

En situaciones de emergencia, se puede realizar una determinación rápida del grupo ABO en portas o placas. El método es satisfactorio si se emplean reactivos de determinación del grupo potentes (v. pág. 428). Es preferible un método en tubo con centrifugación inmediata.

Método de microplacas en fase líquida

La tecnología de microplacas en fase líquida proporciona un método barato y seguro para series de pruebas, cuando se emplea la semiautomatización para la dispensación y lectura; es la técnica de determinación del grupo que con más frecuencia se usa en el Reino Unido. La determinación de los grupos ABO y D puede realizarse en una única microplaca si se emplean reactivos monoclonales. Para la determinación del grupo es recomendable la técnica de resuspensión, empleando microplacas de poliestireno rígidas con pocillos en U no tratados. Si las microplacas se reutilizan deberían lavarse con un detergente suave, aclararse minuciosamente con agua destilada y ser dejarlas secar boca abajo; también podría emplearse un baño ultrasónico. Las placas rayadas o dañadas deberían desecharse.

La placa se diseña normalmente como 12 × 8 (12 pruebas y 8 reactivos), pero puede usarse en la dirección opuesta (8 × 12), dependiendo del número de reactivos y controles requeridos. Los reactivos anti-D deberían mantenerse alejados de los reactivos anti-A y anti-B porque pueden producirse salpicaduras entre pocillos cuando se dispensan los reactivos o con el manejo manual de las placas durante la prueba si no se tiene suficiente cuidado. Se recomienda el siguiente método[22]:

1. Añadir 1 gota de antisuero y diluyente control (si es preciso) a cada pocillo apropiado.
2. Añadir 1 o 2 gotas de plasma/suero problema a los pocillos apropiados para la determinación inversa del grupo y el autocontrol (si es preciso).
3. Hacer una comprobación visual para asegurar que no hay pocillos vacíos.
4. Añadir una gota de una suspensión celular al 3% de las células problemas en el pocillo adecuado que contenga antisuero, diluyente control y autocontrol.
5. Añadir 1 gota de reactivo de eritrocitos al 3% a los pocillos apropiados que contengan el plasma/suero problema.
6. Agitar cuidadosamente para mezclar, preferiblemente empleando un agitador de microplacas.
7. Dejar la placa incubando a temperatura ambiente durante 15 min y centrifugar a 100 g durante 40 s.
8. Resuspender los eritrocitos empleando un agitador de microplacas. La agitación excesiva reduciría la fuerza de aglutinación. Debe recordarse que en los métodos de microplaca los aglutinados formados por algunos tipos más débiles de D débil podrían romperse y ser interpretados como D negativo.
9. Los resultados pueden leerse visualmente o con un lector automático de placas.

Técnicas de aglutinación en columna (fig. 20.5)

Las técnicas de aglutinación (v. cap. 19, pág. 428) empleando un gel de sephadex (DiaMed ID) o una matriz de microesferas de cristal (Ortho BioVue) se emplean de manera creciente para la determinación del grupo, especialmente cuando existen sistemas automatizados; estas técnicas deberían siempre realizarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El número de reactivos y controles está limitado a seis, lo que hace imposible la inclusión de dos reactivos anti-D, un control y un grupo inverso además del grupo celular. Hay varios perfiles diferentes para elegir, y algunas tarjetas/casetes incluyen anticuerpos monoclonales frente a otros antígenos del grupo sanguíneo (p. ej., K) además de ABO o D. La determinación globular o sérica del grupo puede hacerse con diferentes tarjetas/casetes.

Técnicas en fase sólida

La determinación del grupo ABO/D utilizando técnicas en fase sólida debería emplearse como parte de un sistema completamente automatizado y se deberían realizar las pruebas de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Controles

En cada prueba o batería de pruebas deberían incluirse un control positivo y negativo. El reactivo anti-A debería enfrentarse a células del grupo A (control positivo) y B (control negativo), y el reactivo anti-B a células del grupo B (control positivo) y grupo A (control negativo). En sistemas



Figura 20.5. Tecnología de aglutinación en columna: grupo sanguíneo O D positivo.

Tabla 20.2. Células control para la determinación del grupo sanguíneo

Reactivo	Control positivo	Control negativo
Anti-A	Células A	Células B
Anti-B	Células B	Células A
Anti-D	Células D positivas	Células D negativas
Células A_1	Anti-A	Anti-B
Células B	Anti-B	Anti-A

completamente automatizados, los controles deberían realizarse al menos dos veces al día, haciéndolos coincidir con el encendido de la máquina y el cambio de reactivos, teniendo en cuenta el tiempo que los reactivos se han mantenido a temperatura ambiente en la máquina. Las muestras control deberían ser cargadas del mismo modo que las muestras problema. En la tabla 20.2 se muestran los controles necesarios. Cuando los controles no dan las reacciones esperadas, debe realizarse un análisis para determinar la validez de todas las pruebas realizadas posteriormente al último resultado con un control válido.

Causas de discrepancia en la determinación del grupo ABO/D

Reacciones falso positivo

Formación de pilas de monedas (rouleaux) *o cilindros hemáticos*

El fenómeno de la formación *rouleaux* puede darse en varias situaciones clínicas, en las que la proporción normal del albúmina y globulinas del plasma está alterada (p. ej., mieloma múltiple) y en presencia de sustitutos del plasma, como los dextranos. El apilamiento de los eritrocitos en columnas podría ser mal interpretado como una aglutinación débil por observadores inexpertos (v. fig. 20.6). Los cilindros hemáticos normalmente se dispersan y forman una lámina de células si se añade una gota de solución salina; alternativamente, la determinación indirecta del grupo puede repetirse empleando plasma/suero diluido con solución salina a 1:2 o 1:4.

Autoaglutinación por frío y aloanticuerpos que reaccionan al frío

Los autoanticuerpos fríos que reaccionan a temperatura ambiente pueden producir una autoaglutinación celular (ABO y D) y una aglutinación completa en la prueba sérica de determinación de grupo, causando una determinación anormal del grupo (v. pág. 218). Las pruebas deberían repetirse empleando células lavadas en solución salina y plasma/suero precalentados a 37 °C, incluyendo un autocontrol. Los aloanticuerpos que reaccionan en frío (p. ej., anti-P_1) pueden causar aglutinación de las células en la determinación sérica del grupo y si se sospecha su presencia, la prueba debe repetirse empleando plasma/suero precalentado o células para determinación del grupo que carezcan de los antígenos implicados.

Activación-T/poliaglutinación

La poliaglutinación[23] describe la aglutinación de los eritrocitos por todos o la mayoría de los sueros adultos normales, como consecuencia de anticuerpos IgM que reaccionan con un antígeno desconocido de los eritrocitos. La forma más común es la activación-T, que ocurre cuando la neuraminidasa, producida por bacterias, rompe el ácido N-acetil neuramínico de las membranas de los eritrocitos, exponiendo el antígeno T.

Esto puede ser un problema cuando se determina el grupo con reactivos policlonales, que contienen anti-T, y se produce clínicamente más a menudo en recién nacidos y

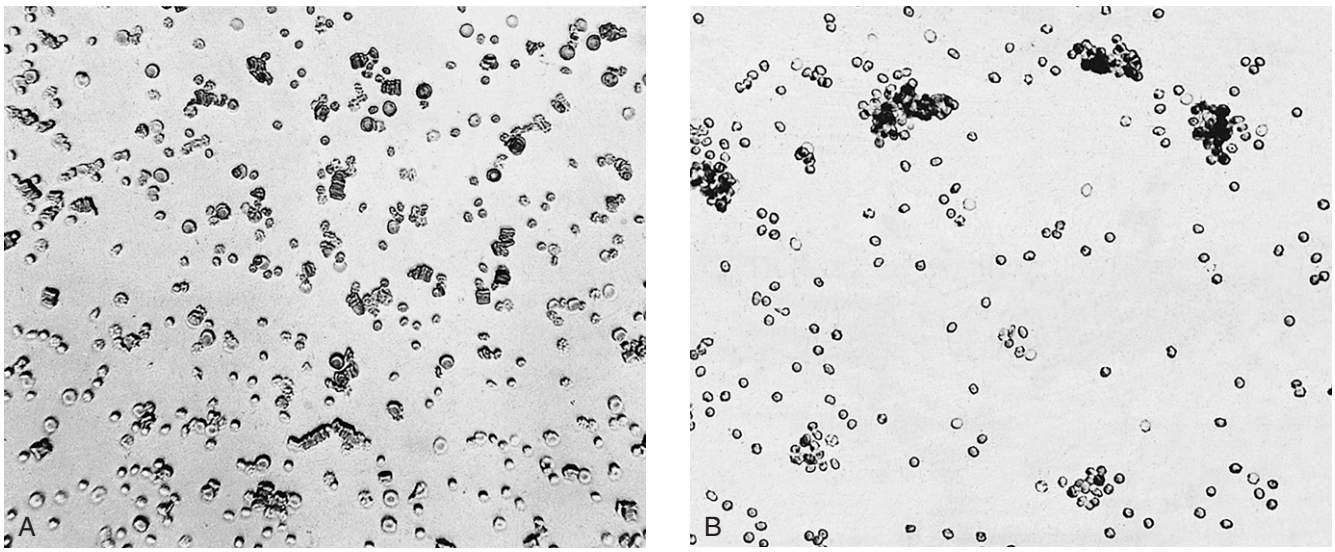


Figura 20.6. Microfotografía de una suspensión de eritrocitos en suero que muestran un grado leve de formación de hematíes en pilas de monedas *(rouleaux)* (A) y aglutinación débil (B).

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

niños pequeños (p. ej., recién nacidos con enterocolitis necrosante). Las pruebas que emplean reactivos monoclonales no se afectan por este fenómeno. Cuando se sospecha o cuando se ha diagnosticado una enterocolitis necrosante es necesario llevar a cabo pruebas especiales para confirmar la activación T.

Antígeno B adquirido

El antígeno B adquirido se debe normalmente a la desacetilación de los eritrocitos A_1 por enzimas bacterianas de eritrocitos. Algunos reactivos anti-B reaccionan fuertemente con los antígenos B adquiridos (p. ej., aquellos derivados del clon ES4)[24]. Esto suele producir normalmente una discrepancia entre las pruebas globular y sérica de determinación del grupo, lo que podría ser pasado por alto si el anti-B propio del paciente es débil o si se omite la prueba indirecta. Deberían evitarse estos reactivos anti-B.

Potenciadores

Los eritrocitos pueden estar cubiertos con IgG como resultado de una sensibilización *in vivo*. El uso de técnicas potenciadas, como la prueba de antiglobulina para la determinación del D, o de reactivos potenciados para la determinación del grupo ABO o D puede tener como resultado un falso positivo; los últimos pueden además producir una reacción positiva con el diluyente control, pero los datos del NEQAS del Reino Unido[25] han mostrado que algunos laboratorios fallan en la inclusión de un control apropiado o en la comprensión del significado de un control positivo. Por esta razón, no es aconsejable el uso de técnicas o reactivos potenciados para la determinación del grupo sanguíneo.

Anticuerpos contaminantes

Los reactivos policlonales anti-D eran susceptibles a la contaminación por anticuerpos de otras especificidades que no hubieran sido adecuadamente absorbidos (p. ej., no era infrecuente que un reactivo anti-D se contaminase con anti-A, anti-B o anti-C, conduciendo a resultados falso positivo con eritrocitos A, B o r′, respectivamente).

Contaminación bacteriana in vitro

La contaminación bacteriana *in vitro* de los antisueros, los eritrocitos del paciente o las células de la determinación sérica del grupo puede causar una aglutinación falsamente positiva.

Reacciones falso negativo

Fallos al añadir los reactivos

La causa más frecuente de una determinación falso negativo del grupo es el error al añadir los reactivos o el plasma/suero problema. Por esta razón, en las pruebas en fase líquida, el suero o plasma debería ser siempre añadido primero al compartimento de reacción y hacer una comprobación visual antes de añadir los eritrocitos. A este respecto, es útil el uso de reactivos con códigos de color para la determinación del grupo ABO.

Pérdida de potencia

El almacenamiento o congelación y descongelación inapropiados pueden causar una pérdida de potencia de los reactivos para la determinación del grupo sanguíneo. El uso frecuente de controles alertará al usuario de este problema.

Error en la identificación de lisis

En presencia de complemento, anti-A y anti-B pueden causar lisis *in vitro* de los eritrocitos de control. Si la lisis no se reconoce como una reacción positiva, los resultados pueden leerse como falsamente negativos en la prueba indirecta o sérica de la determinación de grupo. Para evitar esto, las células de la determinación inversa del grupo deberían resuspenderse en solución salina con EDTA, si se usa plasma en lugar de suero (v. fig. 20.4).

Aspecto de campo mixto

En la determinación de los grupos ABO y D puede aparecer una población dual de eritrocitos. Es importante reconocer esto como una imagen de campo mixto y no confundirlo con una aglutinación débil. La causa más probable de una imagen de campo heterogéneo es la transfusión (tanto deliberada como accidental) de eritrocitos no idénticos en los grupos ABO o D. Se requieren análisis para determinar el grupo sanguíneo real del paciente, que podría haber sido transfundido en una institución diferente o podría haber recibido una transfusión intrauterina. Un grupo ABO con campo mixto podría ser el primer indicador de una transfusión previa con incompatibilidad ABO.

Un trasplante de médula ósea con incompatibilidad ABO o D podría producir una imagen de campo mixto hasta que se produce la total implantación del injerto; la imagen de campo mixto puede posteriormente reaparecer cuando un implante está fallando. En raras ocasiones, la población dual de células es permanente y es el resultado de un subgrupo débil de A (A_3) o un grupo sanguíneo quimérico. La interpretación de las poblaciones duales de eritrocitos dependerá de la técnica usada. En un tubo, la lectura microscópica revelará fuertes aglutinados en un mar de células libres; en las técnicas de aglutinación en columna habrá una línea de células aglutinadas en lo alto de la columna, con las células negativas moviéndose por la parte baja de la columna. Los sistemas automáticos deberían estar programados para detectar imágenes de campos mixtos.

Variantes fenotípicas D

Los resultados discrepantes entre diferentes reactivos anti-D o resultados débiles son generalmente el resultado de fenotipos D débiles o parciales. En el D débil está presente el antígeno D completo, pero con menos puntos de antígeno D por célula. Los pacientes con D débil son incapaces de formar anti-D y podrían ser tratados como D positivos. Sin embargo, una reacción débil con un único reactivo anti-D debería ser evaluada con un segundo anti-D antes de asignar el resultado como D positivo. Es esencial ser capaz de distinguir entre una reacción débil y una reacción de campo mixto, porque este último caso podría conducir a la

transfusión a un paciente D negativo con sangre D positiva. Ante la duda es más seguro considerar al paciente como D negativo, al menos hasta que se hayan realizado investigaciones en el centro de referencia. Con ello no habría consecuencias clínicas, porque es seguro transfundir sangre D negativa a un paciente D positivo y es improbable que la inyección de anti-D profiláctica a una mujer embarazada D positiva sea perjudicial. La mayoría de las formas débiles D son D positivos con los reactivos comerciales anti-D monoclonales de alta afinidad que se usan actualmente.

Cuando se obtienen reacciones diferentes con dos reactivos distintos, el paciente podría ser un D parcial (p. ej., cuando se han perdido uno o más epítopos del antígeno D). Estos individuos son capaces de formar anti-D tras sensibilización con el epítopo ausente. La variante D[a] carece de la mayoría de los epítopos, y es probable que estos individuos formen anti-D cuando son estimulados por transfusión o embarazo. Por esta razón, los reactivos anti-D para la determinación rutinaria del grupo de muestras de pacientes no deberían detectar D[VI]. Hay pocas pruebas que sugieran que un donante D[VI] podría desencadenar una respuesta inmune en un receptor D negativo; sin embargo, un donante D positivo débil, incluyendo donantes D[VI], debería clasificarse como D positivo. Hay algunas diferencias étnicas importantes en la frecuencia de diferentes haplotipos Rh, como se muestra en la tabla 20.3.

Tabla 20.3. Frecuencias aproximadas de haplotipos comunes en poblaciones seleccionadas[26]

	Frecuencia aproximada		
Haplotipo	Inglesa	Nigeriana	China
DCe R¹	0,421	0,060	0,730
dce r	0,389	0,203	0,023
DcE R²	0,141	0,115	0,187
Dce R⁰	0,026	0,591	0,033
dcE r″	0,012	0	0
dCe r′	0,010	0,031	0,019

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS

La detección de anticuerpos se suele realizar al mismo tiempo que la determinación del grupo sanguíneo y antes de la selección de las unidades de sangre para la transfusión. La identificación de anticuerpos puede ser más real y sensible que las pruebas cruzadas contra las células del donante porque algunos anticuerpos reaccionan con más fuerza con eritrocitos con expresión homocigota (dosis doble) de los antígenos relevantes que con los de expresión heterocigota (dosis simple): especialmente anti-Jk[a]/Jk[b] pero también anti-Fy[a], -Fy[b], -S, y –s. Las células seleccionadas puede elegirse para reflejar esto, mientras que las células de la unidad donada son normalmente de cigosidad desconocida. Además, los eritrocitos empleados para detectar la presencia de anticuerpos irregulares son más fáciles de estandarizar que las células de la donación, y potencialmente hay menos posibilidades de error en el procedimiento, particularmente al utilizar sistemas automáticos.

Los anticuerpos clínicamente significativos son aquellos capaces de causar morbilidad al paciente como resultado de una destrucción acelerada de una proporción significativa de las células transfundidas. Con pocas excepciones, los anticuerpos clínicamente significativos son aquellos que reaccionan en la prueba de antiglobulina indirecta a 37 °C; sin embargo, no es posible predecir serológicamente cuáles de estos anticuerpos tendrán significación clínica definitiva, por lo que suele emplearse el término «de significación clínica potencial».

[a] La determinación del genotipo del ADN del glóbulo rojo puede cambiar nuestra definición de D débil y parcial.

Panel de hematíes

El plasma o suero del paciente debería enfrentarse al menos a dos tipos de células de cribado, estudiadas por separado y no agrupadas. Las células de cribado deben ser del grupo O y abarcar los antígenos más frecuentes en la población autóctona.

En el Reino Unido, deberían expresarse como mínimo los siguientes antígenos: C, c, D, E, e, K, k, Fy[a], Fy[b], Jk[a], Jk[b], S, s, M, N y Le[a]; una célula debería ser R_2R_2 y otra R_1R_1 o $R_1^wR_1$. Los siguientes fenotipos también deberían estar representados en el conjunto de selección: Jk(a+b–), Jk(a–b+), S+s–, S–s+, Fy(a+b–) y Fy(a–b+) (v. tabla 20.4). Estas recomendaciones para homocigosidad están basadas en datos del Reino Unido acerca de la incidencia de reacciones transfusionales hemolíticas tardías, la necesidad de una mayor sensibilidad en la detección de anticuerpos Kidd y el bajo rendimiento de las técnicas de aglutinación en columna en la detección de algunos ejemplos de anticuerpos Kidd empleando células heterocigotas[2,26]. Los requerimientos para la expresión de antígenos C[w] y Kp[a] en las células de detección han sido causa de muchos debates, y realmente no hay un consenso internacional. En el Reino Unido y en los Estados Unidos no se requiere la detección de anti-C[w] o anti-Kp[a] incluso en ausencia de una prueba cruzada con antiglobulina[9,27]. Ello es debido a que son antígenos de baja frecuencia y los anticuerpos rara vez causan una reacción transfusional hemolítica tardía o enfermedad hemolítica grave del recién nacido.

Métodos

La evaluación de anticuerpos siempre debería realizarse mediante una prueba de antiglobulina indirecta como método primario. También pueden usarse métodos adicionales (p. ej., enzimáticos en dos fases o Polibreno) pero son peores para la detección de algunos anticuerpos clínicamente significativos y no deberían usarse de forma aislada. Un gran estudio retrospectivo mostraba que la gran mayoría de

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 20.4. Expresión de los antígenos de los eritrocitos en el panel de hematíes[9]

Sistema del grupo sanguíneo	Antígeno	Células hemocigotas recomendadas
Rh	C	Sí (R_1R_1 o $R_1^WR_1$)
	c	Sí (R_2R_2)
	D	Sí (R_1R_1 y R_2R_2)
	E	Sí (R_2R_2)
	e	Sí (R_1R_1 o $R_1^WR_1$)
Kell	K	No[a]
	k	No (probablemente siempre)
Duffy	Fy^a	Sí
	Fy^b	Sí
Kidd	Jk^a	Sí
	Jk^b	Sí
MNSs	M	No
	N	No
	S	Sí
	s	Sí
Lewis	Le^a	No

[a] Aunque deseable, es improbable que se encuentren células KK.

anticuerpos detectados sólo por una técnica enzimática no son clínicamente significativos[28]. En el estudio de Issitt, llevado a cabo con 10.000 pacientes recientemente transfundidos, sólo un anti-c inicialmente no reactivo por la prueba de antiglobulina indirecta causó una reacción transfusional hemolítica retardada. Ha habido sólo un informe de un anti-E, que sólo era detectable por la prueba de antiglobulina indirecta postransfusional, que provocó una reacción transfusional hemolítica retardada[1]. Para las técnicas en fase líquida, la guía del BCSH recomienda el uso de eritrocitos suspendidos en LISS, más que en solución salina estándar con fuerza iónica normal, porque el LISS incrementa la sensibilidad de detección de muchos anticuerpos potencialmente significativos desde el punto de vista clínico[9,25]. Hay informes conflictivos sobre si se puede mejorar la sensibilidad añadiendo polietilenglicol[29,30].

Técnicas de antiglobulina indirecta

Aglutinación en columnas

En muchos países actualmente se usa más la aglutinación en columna que las técnicas tradicionales en tubo o microplacas en fase líquida porque se ha demostrado que es al menos tan sensible como una técnica estándar en tubo con LISS[30,31], es más simple de desarrollar porque no requiere fase de lavado, emplea menores volúmenes de plasma/suero y reactivos, la fase de lectura es más objetiva y es fácil de automatizar. La antiglobulina humana (AGH) incorporada en la matriz está disponible como un reactivo poliespecífico o anti-IgG. Las concentraciones de los eritrocitos y los volúmenes pueden ser críticos y es importante seguir las instrucciones del fabricante en todo momento. De manera similar, también se dispone de microcolumnas que emplean una matriz de gel de afinidad, a la que se incorporan la proteína G y la proteína A, más que el anti-IgG.

Se ha demostrado que las pruebas cruzadas en columnas de aglutinación son menos sensibles que las técnicas estándar en tubo para la detección del los anticuerpos ABO débiles como anti-A con células A_2B[25,32,33] y anticuerpos Kidd con eritrocitos heterocigotos[25]. Se ha sugerido que estos fallos podrían ser el resultado de fuerzas de cizallamiento que se producen durante la centrifugación, que causan que los aglutinados débiles se rompan, especialmente cuando la densidad del antígeno es baja[32].

Sistemas en fase sólida

Las técnicas en fase sólida (p. ej., Capture-R [Immucor] y Solid Screen II [Biotest]) también se han hecho más populares porque se ha demostrado que tienen un alto nivel de sensibilidad y se prestan a la automatización completa[30].

Técnicas en fase líquida: tubos y microplacas

Las técnicas en tubo se usan todavía para la detección de anticuerpos en algunas partes del mundo. Con las técnicas de suspensión en LISS es importante mantener una alta proporción suero:células, sin afectar a la fuerza iónica. Con volúmenes iguales de suero y suspensiones celulares en LISS al 1,5-2%[34] se consigue una proporción suero:células mayor de 60:1, lo que asegura una sensibilidad óptima. Los reactivos deben incubarse durante 15-20 min a 37 °C y seguidamente las células serán lavadas con PBS. Después de añadir AGH, los eritrocitos deberían ser examinados usando un cuidadoso procedimiento de «inclinación y rotación» para prevenir la ruptura de los aglutinados débiles. También pueden emplearse en esta técnica facilitadores de lectura como una caja de luz o un espejo cóncavo.

La tecnología de microplacas en fase líquida nunca ha alcanzado una enorme popularidad para la detección de anticuerpos porque es relativamente difícil de introducir y estandarizar y no puede ser automatizada. No se detalla ningún método aquí, porque cada vez es más difícil obtener reactivos estandarizados AGH para uso en microplacas. Sin embargo, existe más información disponible en las guías del BCSH, incluyendo un método recomendado para la detección en placa con pocillos en V, usando una técnica de extensión[9].

Controles

Debería usarse un anti-D débil de manera regular para asegurar la eficacia del procedimiento completo, aunque la frecuencia exacta dependerá de los patrones de trabajo, como se describe en la sección de la determinación del grupo sanguíneo. También se recomienda el empleo de controles débiles adicionales para confirmar la sensibilidad del

procedimiento y la integridad de los antígenos de los eritrocitos durante su vida útil; los anti-Fy^a y/o anti-S son buenos ejemplos, porque los antígenos Duffy y S son lábiles y pueden deteriorarse más rápidamente sobre las células reactivas que el antígeno D, y su uso también asegurará que las células tratadas con enzimas no se han usado por error. Debería estudiarse la selección de controles que demuestren que se han añadido las células de detección correctas a la batería de pruebas.

El empleo de eritrocitos débilmente sensibilizados con anti-D es esencial para controlar la fase de lavado de todas las pruebas de fase líquida negativas, porque el lavado inadecuado puede conducir a una neutralización completa o parcial de las AGH por globulinas no fijadas. Cualquier prueba que no dé una reacción positiva con la fuerza esperada, tras la adición de estas células (y subsiguiente centrifugación), indica insuficiente anti-IgG libre y debería repetirse. La fase de lavado de los sistemas en fase sólida es difícil de controlar y podría ser necesario añadir un control débil a cada columna para asegurar que todas las sondas han dispensado solución salina durante cada ciclo de lavado.

IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS

Cuando se detecta un anticuerpo en la fase de cribado, debería determinarse su especificidad y valorarse su probable significación clínica antes de seleccionar la sangre para transfusión o dar consejos relevantes durante el embarazo. Es esencial un enfoque sistemático de la identificación del anticuerpo para asegurar que se identifican todas las especificidades de potencial significado clínico. Podría ser tentador encajar un patrón de reacción inmediatamente y no buscar más, pero es probable que ello conduzca a la ausencia de identificación de especificidades adicionales.

Principios

Como punto de inicio, el plasma/suero problema debería enfrentarse a un panel de identificación de eritrocitos de fenotipo conocido mediante la técnica con la que fue detectado en la prueba de detección. La siguiente sección sobre reactivos resume los requerimientos mínimos para el panel. La inclusión de una prueba de autoanticuerpos es útil para distinguir entre un autoanticuerpo, un anticuerpo dirigido contra un antígeno de alta frecuencia y una compleja mezcla de aloanticuerpos. Las reacciones positivas y negativas deberían ser comparadas con el perfil del panel, en conjunción con los resultados de la prueba de detección.

Cada especificidad del anticuerpo debería valorarse individualmente, y su presencia debería excluirse sistemáticamente por identificación de células antígeno positivas que han dado reacciones negativas; cuando sea posible debería obtenerse una reacción negativa con un glóbulo rojo con expresión homocigota del antígeno relevante; por ejemplo, si se ha obtenido una reacción negativa contra una célula Jk(a+b–), puede excluirse la presencia de anti-Jk^a, pero cuando las reacciones negativas son sólo contra células Jk(a+b+), entonces no se puede excluir inmediatamente de manera segura el anti-Jk^a. Esto dejará una lista de especificidades potenciales, que deberían ser consideradas por compatibilidad de las reacciones positivas con las células portadoras del antígeno o positivas, para determinar cuál se encuentra realmente en la célula. Una vez se completa este proceso con el panel inicial de detección e identificación, podría ser necesario utilizar más células y técnicas para completar el proceso de exclusión (p. ej., cuando se ha identificado la presencia de anti-S, puede ser necesario un panel tratado con enzimas para excluir la presencia de anti-E, cuando todas las células E positivas fueron también S positivas, o podría ser necesario seleccionar unas células K+S– para excluir la presencia de anti-K). Cuantas más especificidades existan, más complicado será el proceso y, si los recursos son limitados, podría ser necesario enviar las muestras a un centro de referencia para aclarar todas las especificidades. Si se dispone de antisueros, la determinación del fenotipo de los eritrocitos del paciente de manera precoz permitirá la exclusión de especificidades para las que el paciente es antígeno positivo.

La especificidad de un anticuerpo debería sólo asignarse cuando reacciona con al menos dos muestras de eritrocitos reactivos que contengan el antígeno y no reacciona con al menos dos muestras de eritrocitos reactivos que carezcan del antígeno. Esto se debe a que podría producirse una única reacción positiva si el panel de células inesperadamente expresa un antígeno de baja frecuencia, y podría ocurrir una única reacción negativa si las células del panel carecieran de un antígeno de alta frecuencia.

Determinación del fenotipo

Cuando se identifica un anticuerpo, debería determinarse el fenotipo de los eritrocitos propios del paciente para el antígeno relevante. Si los eritrocitos del paciente son negativos para los antígenos, se confirma que el paciente es capaz de generar anticuerpos de una particular especificidad. Si los eritrocitos del paciente son positivos para el anticuerpo, ello sugiere una de las siguientes opciones:

1. El anticuerpo es un autoanticuerpo, en cuyo caso la prueba de antiglobulina directa debería ser positiva.
2. Los eritrocitos están recubiertos de anticuerpos y se ha empleado un método potenciado para determinar el fenotipo, invalidando de esta manera el resultado.
3. El resultado de la identificación inicial es incorrecto.

La determinación ampliada del fenotipo puede ser útil cuando existe una mezcla de anticuerpos porque permitirá la exclusión de anticuerpos específicos para antígenos para los que el paciente es positivo, reduciendo el número requerido de células reactivas adicionales.

Paneles y técnicas adicionales

La probabilidad de identificar anticuerpos cuando existen dos especificidades mejora significativamente mediante el

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

uso de técnicas enzimáticas en dos fases, siempre que al menos uno de los antígenos relevantes se afecte por enzimas[25] (p. ej., los anticuerpos Rh son potenciados por las enzimas proteolíticas, mientras que los antígenos M, N, S, Fy^a y Fy^b son destruidos por estas mismas enzimas). De manera similar, cuando se ha identificado una mezcla de dos anticuerpos, dos paneles diferentes de células fenotipadas proporcionan una mayor probabilidad de excluir especificidades adicionales.

La aglutinación directa a temperatura ambiente o a 4 °C puede ser útil para distinguir entre un anticuerpo de potencial significación clínica y un anticuerpo que reaccione en frío; de nuevo, esto es particularmente útil cuando hay una mezcla de anticuerpos. Casos débiles de anticuerpos Kidd a menudo se potencian con el uso de una prueba de antiglobulina indirecta, empleando células tratadas con enzimas, lo que puede ser particularmente útil cuando en esta prueba el anticuerpo reacciona sólo contra células homocigotas en la prueba de antiglobulina indirecta.

Reactivos

Un panel de identificación debería constar de eritrocitos de al menos ocho donantes del grupo O, aunque en los paneles comerciales son más frecuentes diez, lo que permite una más fácil interpretación de la mezcla de anticuerpos. Para ser funcional, el panel debe permitir una identificación segura de los anticuerpos clínicamente significativos más frecuentemente encontrados. Las guías del Reino Unido[9] pueden resumirse de la siguiente manera:

1. Por cada anticuerpo antieritrocitario clínicamente significativo de detección frecuente, deberían haber al menos dos muestras carentes del antígeno y al menos dos muestras portadoras del antígeno correspondiente.
2. Al menos debería haber dos muestras de cada unos de los fenotipos R_1R_1 y $R_1^wR_1$. Entre ellos, estas dos muestras deberían expresar los antígenos K, k, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, M, N, S, y s.
3. Debería haber al menos una muestra de los fenotipos R_2R_2, r′r y r′′r y al menos dos muestras del fenotipo rr.
4. Los siguientes fenotipos deberían ser expresados en muestras carentes de antígenos D y C: K+, K–, Jk(a+b–), Jk(a–b+), S+s–, S–s+, Fy(a+b–) y Fy(a–b+). El panel debería ser capaz de resolver tantas mezclas de anticuerpos como sea posible.

Tarjetas de anticuerpos

Las reacciones transfusionales hemolíticas tardías pueden ocurrir cuando no se detectan anticuerpos o se han identificado incorrectamente, a menudo por una institución diferente[1,2]. Se ha sugerido que las tarjetas de anticuerpos emitidas por el hospital o el centro de referencia deberían ser llevadas por el paciente para su presentación al ingreso en el hospital. Para ser efectivas, las tarjetas deberían ir acompañadas de un impreso con información sobre el paciente, explicando la significación de los anticuerpos, y ser preferiblemente entregada personalmente al paciente por alguien con claros conocimientos sobre práctica transfusional. Hay obstáculos potenciales a esta sugerencia, sobre todo cuando el nivel de destreza en la identificación de anticuerpos y en la apreciación de su significado clínico varía entre instituciones. Una estrategia mejor podría tener una base de datos nacional que incluyera la presencia de anticuerpos clínicamente significativos.

SELECCIÓN Y TRANSFUSIÓN DE ERITROCITOS

Una vez que se ha determinado el grupo sanguíneo del paciente e identificado los anticuerpos, se requiere una serie de procedimientos para seleccionar las unidades de eritrocitos que son adecuadas para la transfusión. Éstas incluyen la selección de unidades ABO/D compatibles, que necesitan también ser negativas para los antígenos frente a los que el paciente tiene aloanticuerpos antieritrocitarios clínicamente significativos (v. tabla 20.5); sin embargo, es importante que se incluya una selección basada en ciertos criterios clínicos (p. ej., los requerimientos de eritrocitos CMV negativos, irradiados o lavados). La selección de acuerdo a estos criterios depende de una correcta información clínica, una precisa determinación del grupo sanguíneo ABO y D y una sensible prueba de detección de anticuerpos.

Algunos pacientes precisan la transfusión de sangre de manera definitiva, mientras que otros podrían someterse a una cirugía en la que se cruza la sangre sólo para estar «preparados» frente a cualquier posible eventualidad. Las auditorías han mostrado que la sangre se cruza a menudo pero no es transfundida. La proporción de transfusiones o índice de pruebas cruzadas puede ser usada para valorar lo bien que se manejan las reservas de sangre. Una opción es realizar un grupo sanguíneo del paciente y la detección de anticuerpos y reservar la muestra y sólo realizar las pruebas cruzadas si se encuentran ciertas indicaciones prefijadas para llevar a cabo las transfusiones. La política local debería definir un máximo de requerimientos de sangre para la programación quirúrgica, indicando qué procedimientos quirúrgicos pueden ser «grupo y detección/grupo y reserva» y cuántas unidades de sangre deben ser cruzadas para procedimientos con una elevada probabilidad de transfusión intraoperatoria[35]. La decisión de qué categoría se elige puede relacionarse con factores locales incluyendo la proximidad del centro de transfusiones sanguíneas a los quirófanos (u otra localización donde se transfunde la sangre) y el tiempo que lleva proporcionar sangre compatible tras una petición. Una vez se han seleccionado los eritrocitos apropiados, se necesita asegurar su compatibilidad. Esto se refiere normalmente a las pruebas cruzadas, que pueden incluir una prueba de antiglobulina indirecta para comprobar la incompatibilidad como resultado de anticuerpos IgG y anticuerpos ABO o una prueba de centrifugación inmediata para comprobar sólo incompatibilidad ABO. En lugar de pruebas serológicas, la evaluación de la compatibilidad ABO puede basarse en un «control informático», usualmente llamado una «prueba cruzada electrónica». Algunos laboratorios de transfusiones, cuando la cirugía se realiza en un hospital diferente, han extendido la prueba cruzada electrónica a la selec-

Tabla 20.5. Recomendaciones para la selección de sangre para un paciente con anticuerpos antieritrocitarios[9]

Sistema	Anticuerpo	Recomendación
ABO	Anti-A_1	PAI cruzada compatible a 37 °C
Rh	Anti-D, -C, -c, -E, -e	Antígeno negativo[a]
Rh	Anti-C^w	PAI cruzada compatible[b]
Kell	Anti-K, -k	Antígeno negativo[a]
Kell	Anti-Kp^a	PAI cruzada compatible[b]
Kidd	Anti-Jk^a, -Jk^b	Antígeno negativo[a]
MNS	Anti-M (activo a 37 °C)	Antígeno negativo[a]
MNS	Anti-M (no activo a 37 °C)	PAI cruzada compatible a 37 °C
MNS	Anti-N	PAI cruzada compatible a 37 °C
MNS	Anti-S, -s, -U	Antígeno negativo[a]
Duffy	Anti-Fy^a, -Fy^b	Antígeno negativo[a]
P	Anti-P_1	PAI cruzada compatible a 37 °C
Lewis	Anti-Le^a, -Le^b, Le^{a+b}	PAI cruzada compatible a 37 °C
Lutheran	Anti-Lu^a	PAI cruzada compatible a 37 °C
Diego	Anti-Wr^a (anti-Di3)	PAI cruzada compatible[b]
H	Anti-HI (en pacientes A_1 y A_1B)	PAI cruzada compatible a 37 °C
Todos	Otros activos por PAI a 37 °C	Pedir consejo al banco de sangre

Esta guía es útil para pacientes con hipotermia durante la cirugía[26].
[a] Antígeno negativo y pruebas cruzadas compatibles.
[b] Estas recomendaciones son aplicables cuando el anticuerpo está presente como una única especificidad. Si se presenta en combinación, sangre antígeno-negativa debe ser proporcionada por el banco de sangre para prevenir pérdidas de unidades con determinación del fenotipo.
Mollison y cols., 1993. Blood Transfusion in Clinical Practice. Blackwell, Oxford.
PAI, prueba de antiglobulina indirecta.

ción de unidades compatibles, ordenada por el centro de transfusiones, desde una nevera remota.

El proceso de las pruebas cruzadas sanguíneas tiene por objeto evitar la transfusión de hematíes incompatibles y la subsiguiente reacción hemolítica transfusional. Los diferentes tipos de prueba cruzada se resumen en los párrafos siguientes. Con cualquier técnica de pruebas cruzadas que se elija, debe quedar claro que en todos los pacientes con anticuerpos antieritrocitarios conocidos, aunque sean actualmente indetectables, debería hacerse una prueba de compatibilidad con antiglobulina y que estos pacientes no deben incluirse en la estrategia «grupo prueba cruzada/unidad reservada» o para la prueba cruzada electrónica[9,15].

PRUEBAS CRUZADAS

Elección de la técnica

Prueba cruzada con antiglobulina indirecta

Los argumentos para mantener la prueba cruzada con antiglobulina indirecta se basan en el fallo en la identificación de anticuerpos contra antígenos de baja frecuencia en la prueba de detección de anticuerpos. Sin embargo, existen evidencias resumidas por Garratty[27] de que la probabilidad de no detectar un anticuerpo clínicamente significativo es de alrededor de 1 entre 10.615 pruebas cruzadas, si se omite el componente de la prueba de la antiglobulina indirecta y la detección de anticuerpos depende sólo de una detección de anticuerpos sensibles. Además, el desenlace habitual de una transfusión, si existía un anticuerpo y no se detectó por la prueba de detección anticuerpos, se limita a una reducción de la supervivencia de los eritrocitos.

Sin embargo, siempre debería realizarse una prueba de compatibilidad de antiglobulina indirecta si el paciente tiene anticuerpos antieritrocitarios de probable significado clínico, incluso si no son detectables actualmente. Las razones para ello son las siguientes:

1. Actúa como una doble comprobación de que el fenotipo de la donación ha sido determinado correctamente y la sangre etiquetada como negativa para el o los correspondientes antígenos también.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

2. Asegura la compatibilidad serológica, incluso si la identificación del o de los anticuerpos es incorrecta o incompleta.
3. Permite la detección de anticuerpos para antígenos de baja frecuencia no presentes en las células de detección, que podrían encontrarse quizás en un paciente que es claramente un «respondedor» y que podrían quedar enmascarados por otros aloanticuerpos.

Otras circunstancias en que se debería realizar una prueba cruzada de antiglobulinas indirecta son las siguientes:

1. El paciente ha tenido un trasplante de órgano sólido con incompatibilidad ABO y debe transfundirse en los 3 meses tras el trasplante; esto es necesario para detectar IgG anti-A o anti-B que podrían producirse a partir de linfocitos «pasajeros» del órgano trasplantado[36].
2. El paciente tiene un aloanticuerpo de baja significación clínica detectable en la detección rutinaria de anticuerpos; en este caso la sangre podría ser administrada si hay compatibilidad en la prueba de compatibilidad con antiglobulina desarrollada estrictamente a 37 °C, sin necesidad de sangre negativa para el antígeno (v. tabla 20.5).

Los métodos para las pruebas cruzadas con antiglobulina indirecta son los mismos que los empleados para la detección de anticuerpos. Las pruebas cruzadas pueden ser menos efectivas que la detección de anticuerpos para identificar incompatibilidad debida a anticuerpos IgG. Esto se debe parcialmente a que las células pueden mostrar sólo expresión heterocigota de un antígeno frente al que el paciente tiene un anticuerpo, conduciendo, potencialmente, a reacciones más débiles o negativas, y también a que las suspensiones celulares y otras técnicas (p. ej., muestras de la bolsa de donación, etiquetado de tubos, células lavadas, etcétera) son más difíciles de estandarizar y tienen más probabilidades de errores de transposición que los procesos de detección.

Prueba cruzada de centrifugación inmediata

El único propósito de esta técnica es detectar la incompatibilidad ABO. Puede emplearse a fin de suministrar la sangre para una transfusión cuando el paciente tiene un grupo sanguíneo completo y detección de anticuerpos negativa. Puede usarse para cambiar de grupo de prioridad y reservar/cruzar cuando se pide la sangre y se suele asociar a una prueba cruzada con antiglobulina. La prueba cruzada de centrifugación inmediata asegurará que se han seleccionado las unidades correctas y que a la unidad de eritrocitos del donante le ha sido asignado el grupo ABO correcto. Claramente, no es una prueba útil para usar en la detección de incompatibilidad ABO si la prueba sérica de determinación del grupo sanguíneo revela unos anti-A o anti-B muy débiles, o si el paciente pertenece a una de las categorías descritas en la sección previa.

Hay indicios de que esta técnica está poco estandarizada[37], pero su sensibilidad puede optimizarse seleccionando suspensiones celulares, tiempos de incubación y proporción suero:células apropiadas. Se recomienda el siguiente método en tubo:

1. Mezclar 2 volúmenes de plasma/suero con un volumen al 2-3% de células suspendidas en PBS o LISS (o EDTA salino si se emplea suero; v. fig. 20.4).
2. Incubar a temperatura ambiente durante 2-5 min para potenciar la detección de anticuerpos ABO débiles.
3. Leer la reacción cuidadosamente empleando una técnica de «inclinación y rotación».

Resultados falso negativo

La incompatibilidad entre las células donantes A_2B y el suero del grupo B del paciente no se detecta de forma fiel con esta técnica[38]. Tiene aún más importancia el fallo potencial de la aglutinación con anticuerpos ABO[39,40] potentes, a causa de una rápida fijación del complemento que fija C1 y que interfiere con la aglutinación: si se usa suero, los eritrocitos deben suspenderse en solución salina con EDTA (fig. 20.4).

Resultados falso positivo

Los anticuerpos diferentes a los anti-A y anti-B y que reaccionan en frío pueden causar aglutinación en una prueba cruzada de centrifugación inmediata. Esto puede potencialmente causar un retraso en la transfusión mientras se realizan procedimientos adicionales para descartar la incompatibilidad ABO.

Prueba cruzada electrónica

En muchos países la prueba cruzada electrónica se usa habitualmente como una alternativa a la prueba cruzada de centrifugación inmediata, para distribuir la sangre para transfusiones cuando el paciente tiene un grupo sanguíneo completo y no tiene antecedentes de anticuerpos clínicamente significativos. Se seleccionan las unidades ABO y D compatibles y se distribuyen a través de un sistema informático que contiene reglas lógicas para prevenir la dispensación de sangre con incompatibilidad ABO y D.

Tanto la guía del BCSH[15] como los estándares AABB[41] requieren que existan determinaciones concordantes del grupo ABO y D del paciente en al menos dos muestras separadas, al menos una de las cuales debe ser actual. Además, no debe haber detección de anticuerpos clínicamente significativos, ni registro de que se hayan detectado previamente. Las recomendaciones de la AABB indican que se vuelva a comprobar el grupo de la unidad del donante, pero el BCSH acepta una verificación escrita de la exactitud de la etiqueta de la unidad donante por parte del servicio de transfusión que proporciona la sangre. Es altamente recomendado por el BCSH que los procedimientos para la determinación del grupo ABO y D estén automatizados con identificación positiva de la muestra (p. ej., códigos de barras) y transferencia electrónica de los resultados desde el analizador al ordenador del centro de transfusiones, mientras que la AABB no tiene tales requerimientos. Idealmente, los algoritmos informáticos dirigi-

rían el procedimiento, permitiendo sólo la distribución si todos lo criterios son completados: por ejemplo, la distribución de eritrocitos para transfusiones se detendría si sólo existiera un grupo ABO y D en el archivo o si el grupo previo y el actual no coincidieran. El control manual de cualquier parte del proceso incrementa el riesgo de error. La prueba cruzada electrónica, basada en sistemas completamente validados, se ha implantado en varios países desde hace tiempo y se ha probado que es clínicamente segura, siempre que se mantengan las recomendaciones y se sigan estrictamente[42–44].

TRANSFUSIONES URGENTES

En emergencias clínicas en que se requiere soporte inmediato con hematíes, puede no haber tiempo para las pruebas completas de compatibilidad. Se emplean tanto pruebas abreviadas y técnicas rápidas como la administración de células del grupo sanguíneo O. Debe existir un procedimiento documentado para que haya acuerdo en las emergencias. La política local en este tema debería formalmente valorar el riesgo y proporcionar una formación adecuada al personal, particularmente a aquellos que se encargan del servicio fuera de las horas habituales del laboratorio. El personal de guardia debería ser incluido en las pruebas internas de capacitación, así como en ejercicios de valoración externa de la calidad designada a evaluar las técnicas y las pruebas de emergencia.

El centro de transfusiones debería estar implicado en el desarrollo de procedimientos de emergencia en el hospital, incluido el plan de accidentes graves. Todo el personal debería recibir un entrenamiento regular y debería participar en ejercicios prácticos de emergencias. La comunicación es la clave del éxito en el suministro de productos sanguíneos en una emergencia, y el centro de transfusiones necesita estar completamente informado sobre el estado actual del paciente o pacientes para proporcionar un servicio eficiente y oportuno.

Determinación rápida de los grupos ABO y D

En una emergencia debe obtenerse una muestra de sangre previa a la transfusión y el grupo sanguíneo ABO y D del paciente debería determinarse tan rápidamente como fuera posible usando las técnicas ya descritas. Las pruebas en tubo y portaobjetos son las más adecuadas.

Confirmación

Antes de la distribución de sangre de un grupo ABO apropiado, debería realizarse en la muestra una prueba sérica, repetir el grupo hemático o llevar a cabo una prueba de compatibilidad inmediata por centrifugación. Los grupos ABO y D deben siempre confirmarse por una prueba adicional en una segunda alícuota de la muestra. Si se ha proporcionado una muestra inadecuadamente etiquetada, deberían distribuirse unidades del grupo O hasta que pueda analizarse una muestra adicional.

Selección de unidades

Algunos hospitales proporcionan una o dos unidades de hematíes del grupo O y D negativo para uso por los clínicos, a la espera de la disponibilidad de hematíes con compatibilidad ABO y D específica. Debido a la relativamente escasa reserva de hematíes de grupo O y D negativos (sólo el 8% de los donantes de sangre caucásicos son O y D negativos), en el Reino Unido el National Blood Service ha distribuido guías en los hospitales[45] sobre las restricciones en el uso de eritrocitos O y D negativos en pacientes de otros grupos sanguíneos.

Pruebas de compatibilidad

Se pueden distribuir unidades específicas para el grupo sanguíneo tras una prueba de compatibilidad inmediata por centrifugación para comprobar la compatibilidad ABO o, si se dispone de más tiempo, una prueba cruzada con antiglobulina en LISS y detección de anticuerpos irregulares. Si no se realizan pruebas cruzadas, debe comprobarse el grupo de las unidades, a menos que el proveedor haya confirmado la confianza en la validez del etiquetado de la unidad donada. Las unidades distribuidas tras pruebas abreviadas deberían ser etiquetadas como tales (p. ej., «seleccionada para el paciente... pero no cruzada»). Se deberían extraer células de la unidad donada antes de su dispensación para poder permitir las pruebas cruzadas retrospectivas, que siempre pueden realizarse, pero sólo son necesarias si la detección de anticuerpos irregulares ha sido positiva.

Detección de anticuerpos

La buena práctica requiere una detección de anticuerpos y pruebas de compatibilidad simultáneas y la identificación del anticuerpo si la detección es positiva. Si se han distribuido unidades específicas de grupo sin una prueba de compatibilidad de anticuerpos indirecta (o pruebas de compatibilidad con antiglobulinas), debería realizarse una detección de anticuerpos tan pronto como sea posible. Si la detección de anticuerpos es negativa, no es necesario realizar pruebas cruzadas retrospectivas. No es aceptable realizar unas pruebas cruzadas y no realizar una detección de anticuerpos. Cualquier unidad incompatible no transfundida debe ser retirada tan pronto como sea posible.

Transfusión masiva

Se define transfusión masiva como la administración de más de un volumen sanguíneo en 24 h, lo que generalmente significa de media 8-10 unidades para un adulto[46]. Después de la transfusión de este volumen no es necesario realizar una prueba cruzada con antiglobulinas, pero se recomienda una prueba cruzada con centrifugación inmediata para comprobar la compatibilidad ABO o la confirmación electrónica. Si inicialmente se administró sangre no idéntica, tan pronto como sea posible tras la primera transfusión, debería emplearse sangre del mismo grupo del paciente. En algunas situaciones las necesidades de eritrocitos del receptor podrían requerir el uso de unidades in-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

compatibles, pero esta decisión clínica basada en la necesidad de sangre debe sopesarse con la significación clínica conocida de los anticuerpos antieritrocitarios detectados.

Selección de plaquetas y plasma

En situaciones de transfusión masiva pueden requerirse otros productos sanguíneos, y el empleo de plaquetas, plasma fresco congelado y crioprecipitados debería quedar determinado por la evaluación clínica del estado hemostático del paciente además de por recuentos frecuentes en sangre total y pruebas de coagulación. Estas pruebas ayudarán a determinar la necesidad de productos sanguíneos y la respuesta a los mismos.

Errores potenciales

Los errores que conducen a la transfusión de componentes incorrectos de la sangre son más probables fuera de los horarios habituales de los laboratorios; por ello se ha recomendado que sólo deberían hacerse fuera de horas las transfusiones auténticamente de emergencia[1,2].

SEROLOGÍA PRENATAL Y ENFERMEDAD HEMOLÍTICA DEL RECIÉN NACIDO

La determinación del grupo ABO y D materno y la detección de anticuerpos antieritrocitarios deben hacerse de manera rutinaria en las primeras etapas del embarazo. Ésta es la base para la prevención, detección y, con la titulación o cuantificación del anticuerpo, el manejo de la enfermedad hemolítica del recién nacido.

Enfermedad hemolítica del recién nacido

La enfermedad hemolítica del recién nacido es una anemia hemolítica del feto y el recién nacido que ocurre cuando aloanticuerpos maternos frente a antígenos fetales cruzan la placenta y causan hemólisis de los eritrocitos fetales o supresión de los progenitores de los eritrocitos fetales; esto último ocurre con anticuerpos frente al sistema Kell[47].

Como la IgG es la única inmunoglobulina que cruza la placenta, sólo los anticuerpos antieritrocitarios de esta clase son una causa potencial de enfermedad hemolítica del recién nacido. Los anti-D causan la forma más grave de enfermedad hemolítica del recién nacido, pero el éxito de la profilaxis posnatal con inmunoglobulinas anti-D ha reducido el número de casos y la rutinaria profilaxis anti-D prenatal lo reducirá incluso más. La proporción relativa de los otros anticuerpos IgG frente a los eritrocitos se ha incrementado. Aunque la enfermedad hemolítica del recién nacido causada por los anti-D es la forma más grave de la enfermedad, los anti-c pueden ocasionar una significativa hemólisis *intrauterina,* suficiente para causar muerte intrauterina y para justificar su detección en el embarazo. Los anti-K tienen un modo diferente de acción[47], pero también pueden conducir a una grave afectación del feto. Otros anticuerpos IgG (p. ej., anti-E, anti-Ce, anti-Fy^a y anti–Jk^a), aunque de manera poco frecuente, ocasionan una hemólisis fetal de suficiente gravedad para merecer intervención prenatal. La enfermedad hemolítica del recién nacido debida a anticuerpos ABO también es posible y se describe más adelante. Para una discusión detallada de la investigación y tratamiento de la enfermedad hemolítica del recién nacido, se remite al lector a las revisiones de Bowman[48] y al libro de Mollison y cols.[26].

Serología prenatal

Determinación de los grupos ABO y D y detección de anticuerpos

La determinación de los grupos ABO y D maternos, así como la detección de anticuerpos, se realizan de manera precoz en el embarazo (p. ej., en la primera visita) y a la semana 28 de gestación. A todas las mujeres embarazadas, tanto D positivas como negativas, se les debe realizar una detección de anticuerpos antieritrocitarios[49,50]. Las pruebas adicionales dependen de la especificidad de cualquiera de los anticuerpos detectados, de si son capaces de causar enfermedad hemolítica del recién nacido y de la historia obstétrica.

Seguimiento de la detección de anticuerpos

Los protocolos para la detección prenatal y el seguimiento varían entre países. En el Reino Unido, el seguimiento es el recomendado por el BCSH[49,50]:

1. Todas las mujeres embarazadas tienen programada una determinación de ABO y D y una detección de anticuerpos en la primera visita y en la semana 28 de gestación. Si la detección de anticuerpos es negativa en la semana 28, no se requiere la repetición de las pruebas en la semana 36.
2. La mujeres embarazadas con anti-D, anticuerpos frente a antígenos relacionados con el Kell y anti-c deberían ser evaluadas mensualmente hasta la semana 28 y después cada 2 semanas hasta el parto. En estas mujeres debería titularse o cuantificarse el anticuerpo y se deberían buscar anticuerpos antieritrocitarios adicionales.
3. En mujeres embarazadas con otros anticuerpos antieritrocitarios, se realizará la titulación del anticuerpo en la primera visita y de nuevo en la semana 28.
4. Todas las mujeres embarazadas con historia previa de enfermedad hemolítica del recién nacido o aquellas con un incremento significativo de anti-D, anticuerpos frente a antígenos relacionados con el Kell o anti-c, deberían ser remitidas a una unidad especializada para valoración adicional de la necesidad de intervenciones prenatales.
5. Las mujeres embarazadas que tienen anticuerpos antieritrocitarios de otras especificidades, capaces de ocasionar una enfermedad hemolítica del recién nacido y que muestran un incremento significativo en el título de los mismos durante el embarazo, deberían tener su caso hablado con su obstetra. Ahora se sabe que el incremento en la titulación es más predictivo de afección fetal que el nivel concreto de anticuerpo[51].

Predicción del grupo sanguíneo fetal

Pruebas a la pareja

El fenotipo del grupo sanguíneo paterno debería determinarse en todos los casos en que la madre tenga un aloanticuerpo clínicamente significativo. Si los eritrocitos paternos carecen del correspondiente antígeno, el recién nacido no está en riesgo. Sin embargo, se aconseja tener precaución, porque el padre asumido podría no ser el padre biológico del feto. Es útil predecir si la pareja de una mujer que es D negativo y que tiene anti-D es homocigota o heterocigota para el antígeno D. Esto ayuda a pronosticar las probabilidades de tener niños afectados por la enfermedad hemolítica del recién nacido anti-D.

No se dispone de antisueros contra el antígeno «d» porque el alelo «d» no existe. Debido a la falta de anti-«d» sérico, la cigosidad del antígeno se suele predecir por el resultado de las pruebas con anti-c, anti-C, anti-e y anti-E, y a partir de la probabilidad de asociación de los homocigotos o heterocigotos con estos antígenos (v. tablas 20.3 y 20.6). Estos datos han sido recopilados para distintos grupos raciales. Es importante, por ello, indicar al especialista del laboratorio el origen racial del paciente. Dado que actualmente se conoce la base genética para los tipos D habituales, la codificación del ADN proporciona una mejor alternativa para predecir el riesgo de enfermedad hemolítica del recién nacido[52].

Muestras de sangre fetal

Es posible tomar una muestra de sangre fetal, guiada con ecografía, para la determinación del grupo sanguíneo, pero ello conlleva algunos riesgos. La contaminación por sangre materna puede entorpecer el análisis de la muestra obtenida, conduciendo a un resultado falso negativo. Además, el procedimiento en sí puede conducir a hemorragia maternofetal y, por lo tanto, a mayor sensibilización a los antígenos fetales. Existe también riesgo de aborto[53].

Análisis de ADN fetal en la circulación materna

Actualmente es posible detectar ADN fetal en la circulación materna y obtener los grupos D y K de estas células, empleando técnicas de amplificación del ADN (v. cap. 21). Se ha demostrado que esta estrategia es precisa para predecir con precisión el grupo D, y en el Reino Unido actualmente se ofrece como un servicio clínico al comienzo del segundo trimestre[54]. Esta técnica podría reemplazar a pruebas más invasivas y complementar la determinación del grupo en la pareja. Esto es especialmente útil cuando la pareja está ausente o es desconocida.

Valoración prenatal de la gravedad de la enfermedad hemolítica del recién nacido

En los últimos años se ha producido un considerable cambio en la valoración prenatal de la gravedad de la enfer-

Tabla 20.6. Fenotipos Rh más frecuentes con posibles genotipos y frecuencias en una población inglesa (explicando >99% de todos los genotipos Rh en esta población)[53]

Reacción con anti-					Fenotipo/genotipo		
D	C	c	E	e	más probable	Posibles genotipos	Frecuencia
+	+	+	–	+	DCe/dce R_1r	*DCe/dce R^1r* *DCe/Dce R^1R^0* *Dce/dCe R^0r'*	32,68 2,16 0,05
+	+	–	–	+	DCe/DCe R_1R_1	*DCe/DCe R^1R^1* *DCe/dCe R^1r'*	17,68 0,82
–	–	+	–	+	dce/dce rr	*dce/dce rr*	15,10
–	+	+	–	+	Cde/cde r'r	*Cde/cde r'r*	0,76
-	–	+	+	+	cdE/cde r''r	*cdE/cde r''r*	0,92
+	+	+	+	+	DCe/DcE R_1R_2	*DCe/DcE R^1R^2* *DCe/dcE R^1r''* *DcE/dCe R^2r'* *DCE/cde R^zr* *Dce /DCE R^0R^z* *Dce/dCE R^0R^y*	11,87 1,00 0,28 0,19 0,01 <0,01
+	–	+	+	+	DcE/dce R_2r	*DcE/dce R^2r* *DcE/Dce R^2R^0* *Dce/dcE R^0r''*	10,97 0,73 0,06
+	–	+	–	+	Dce/cde R_0r	*Dce/cde R^0r* *Dce/Dce R^0R^0*	2,00 0,07
+	–	+	+	–	DcE/DcE R_2R_2	*DcE/DcE R^2R^2* *DcE/dcE R^2r''*	1,99 0,34

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

medad hemolítica del recién nacido. Se han desarrollado muchas técnicas nuevas no invasivas para valorar el grado de anemia fetal y, si es necesario, proceder a una transfusión intrauterina en los casos gravemente afectados.

Titulación de anticuerpos durante el embarazo

Las técnicas para la titulación de anticuerpos se describen en el capítulo 19, pero tienen reproducibilidad y sensibilidad variables. En algunos laboratorios, las técnicas en tubo han sido reemplazadas por la tecnología de aglutinación en columnas (fig. 20.7) y microplacas. El papel del especialista que estudia los sueros es realizar valoraciones seriadas de anticuerpos para determinar cambios en la titulación o concentración de los anticuerpos. Se recomienda que la técnica escogida para la titulación esté validada contra el anti-D del National Institute for Biological Standards and Control (v. pág. 591)[49]. Por ello, los laboratorios deberían asegurar que los títulos obtenidos con el estándar anti-D están siempre en una dilución al doble, cuando se usa como control interno. Además, las titulaciones de anticuerpos realizadas en el embarazo deberían siempre ser realizadas en paralelo con la muestra previa. Los incrementos en el título de más del doble de una dilución deberían ser siempre controlados conjuntamente con los obstetras.

Cuantificación de anticuerpos

Cada laboratorio individual debería trabajar estrechamente con los laboratorios de referencia y los obstetras. Se considera que la cuantificación automatizada predice con mayor precisión cuándo debe procederse a estudios más activos del feto, pero sólo suele hacerse para anti-D y a veces anti-c. Los resultados en UI o µg/ml se usan como parte de algoritmos clínicos para proceder al siguiente paso del estudio fetal[48,55,56]. Otros métodos para predecir el riesgo fetal incluyen los ensayos celulares, como el ensayo con monocitos monocapa y el ensayo de la citotoxicidad dependiente de anticuerpo, como modelos *in vivo* de hemólisis en el feto. El papel de los ensayos celulares dentro de los estudios *in vitro* para predecir la gravedad de la enfermedad hemolítica del recién nacido ha sido revisada por Hadley[57].

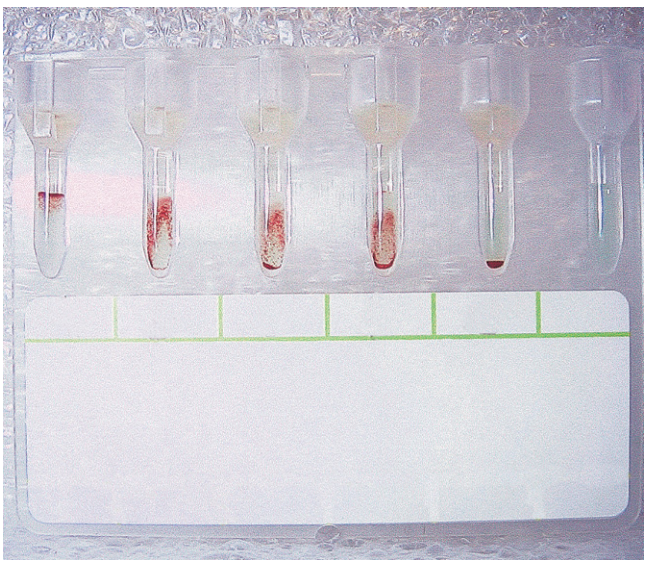


Figura 20.7. Detección de anticuerpos mediante tecnología de aglutinación en columna que muestra reacciones grados 4+ a 0.

Valoración de la anemia fetal

En una madre con incrementos de los niveles de anticuerpos y la sospecha o certeza de un feto portador de antígenos en los eritrocitos contra los que se dirigen los anticuerpos se requiere una valoración de la gravedad de la hemólisis. Tradicionalmente esto se hacía mediante amniocentesis para medir la densidad óptica del líquido amniótico (líneas Lilley) empleando espectrofotometría.

Esto, sin embargo, es una medida indirecta, mientras que el muestreo directo de sangre fetal mediante cordocentesis guiada por ecografía proporciona no sólo información diagnóstica directa, sino que es también un nuevo enfoque del tratamiento fetal por transfusión intravascular fetal directa. Sin embargo, ambos procedimientos conllevan riesgos de aborto y hemorragia fetomaterna adicional[53]. Más recientemente, las unidades especializadas han sido capaces de ofrecer pruebas no invasivas para determinar la gravedad de la anemia fetal; a este respecto, los estudios Doppler de la arteria cerebral han sido muy útiles[58]. La incidencia de la enfermedad hemolítica del recién nacido anti-D está disminuyendo, así como la gravedad de la misma, y el creciente manejo especializado de los embarazos gravemente afectados ha significado que estas mujeres son actualmente derivadas a centros especializados que tratan esta enfermedad precozmente, disminuyendo así la participación del centro de transfusión de base, salvo en los estadios precoces.

Pruebas de sangre materna y de cordón en el parto

En todas las embarazadas con anticuerpos antieritrocitarios deberían recogerse en el parto muestras de sangre para las siguientes pruebas.

Debería existir un protocolo local para estos procedimientos, prestando especial atención a la importancia del etiquetado de las muestras para evitar errores por falta de identificación.

1. *Sangre de cordón* (es preferible a sangre del recién nacido por la cantidad de sangre que se requiere):
   - *a)* Grupos ABO y D y fenotipo de los antígenos de los eritrocitos frente a los que se dirigen los anticuerpos.
   - *b)* Prueba de antiglobulina directa.
   - *c)* Hemoglobina.
   - *d)* Bilirrubina.
2. *Sangre materna:*
   - *a)* Repetir los grupos ABO y D.
   - *b)* Repetir la detección de anticuerpos.
   - *c)* Pruebas para determinar el grado de hemorragia fetomaterna por elución ácida (v. cap. 13) o por citometría de flujo.

Prevención de la enfermedad hemolítica del recién nacido debida a anti-D

La correcta identificación al inicio del embarazo de las mujeres que son D negativas ofrece la posibilidad de administrar inmunoglobulinas anti-D por vía i.m. para prevenir la sensibilización frente al antígeno D durante el embarazo cuando es probable que se produzcan hemorragias fetomaternas[59]. La precisión en la determinación del grupo D es particularmente importante porque las mujeres D negativas consideradas erróneamente como D positivas tienen el riesgo de no recibir inmunoglobulinas anti-D de manera profiláctica (o ser transfundidas con células D positivas). La sensibilización al antígeno D podría resultar en una grave enfermedad hemolítica del recién nacido en embarazos posteriores como resultado del desarrollo de anti-D.

Profilaxis anti-D

Las inmunoglobulinas anti-D deberían administrarse rutinariamente tan pronto como sea posible tras el parto (pero siempre en las primeras 72 h) a las mujeres D negativas que tienen recién nacidos D positivos. Deberían también administrarse a intervalos durante el embarazo cuando pueda ocurrir sensibilización, como al final del embarazo, en una obtención de muestras de vellosidades coriónicas y amniocentesis y tras cualquier traumatismo abdominal. También deberían administrarse para episodios de sangrado vaginal cuando el embarazo se mantiene viable[59]. En el parto, y para eventos sensibilizantes después de la semana 20 de gestación, es necesario cuantificar la hemorragia fetomaterna usando métodos de elución ácida o citometría de flujo, para que pueda administrarse inmunoglobulina anti-D adicional si la dosis estándar no cubre el sangrado estimado. Son necesarias 125 UI de inmunoglobulina anti-D para contrarrestar un sangrado de 1,0 ml de células fetales, y de forma rutinaria en profilaxis se emplean preparados que contienen 500, 1.000, 1.250 y 1.500 UI.

Debido al riesgo de hemorragia fetomaterna durante el embarazo, en algunos países se está ofreciendo a las mujeres una profilaxis anti-D rutinaria prenatal. En el Reino Unido esto ha sido un tema de evaluación por el National Institute of Clinical Excellence[60]. Esta dosis puede administrase en dos dosis en las semanas 28 y 34 o como una única dosis en la semana 28 además de la dosis posnatal. Las mujeres pueden declinar este tratamiento si saben que el padre es D negativo o si no desean tener más embarazos. El análisis del ADN fetal en la circulación materna puede ser usado en el futuro para seleccionar mujeres con fetos D positivos que se beneficiarían de profilaxis adicional, pero por el momento no se ofrece de manera universal.

La administración preventiva de anti-D tiene como consecuencia que la detección de anticuerpos maternos se positiviza. Es difícil distinguir entre anti-D pasivo y bajos niveles de anticuerpos anti-D adquiridos, particularmente en ausencia de una historia de administración de anti-D (que podría haberse realizado en otra institución). Por ello es importante tomar una muestra en la semana 28 para determinar el grupo sanguíneo y la detección de anticuerpos *antes* de la administración de la inyección anti-D. Aunque de forma rutinaria no se necesita la detección de otros anticuerpos[50], acontecimientos en el tercer trimestre podrían conducir al envío de una muestra al centro de transfusiones. Los laboratorios necesitan tener una estrategia para tratar estas muestras: algunos implementan detecciones contra células rr, mientras que otros proceden a una completa identificación de anticuerpos en todas las muestras.

Medición de la hemorragia fetomaterna

Para determinar la cantidad de células fetales en la circulación materna por la diferencia entre células fetales y maternas, se realizan las siguientes pruebas. La más habitual es la elución ácida, que se basa en que la Hb F en las células fetales resiste la elución ácida en mayor medida que la Hb A en las células maternas. El cálculo del volumen de células fetales se basa en el trabajo de Mollison[26], que asume que el volumen de eritrocitos maternos es 1.800 ml, los eritrocitos fetales son un 22% mayores que los maternos y sólo el 92% de las células fetales se tiñen de oscuro (v. página 272). La fórmula del Mollison para calcular el volumen de hemorragia fetomaterna es la siguiente:

$$\text{Volumen de sangre no corregido} = \frac{1.800 \times \text{recuento de células fetales (F)}}{\text{Recuento de células adultas (A)}}$$

$$\text{Corregido para el volumen fetal (1,22)} = \left(1.800 \times \frac{F}{A}\right) \times 1,22 = J$$

$$\text{Corregido para la eficiencia de la tinción (1,09)} = J \times 1,09 = \text{volumen de hemorragia fetomaterna (ml de células fetales)}$$

Ocasionalmente se emplea la prueba de Kleihauer para investigar las muertes intrauterinas o los nacimientos sin vida en los que se sospecha una importante, pero silente, hemorragia fetomaterna como causa de la muerte. A veces, el grupo D de la madre es conocido pero no el del feto. En estas circunstancias, la elusión ácida es de lejos la mejor prueba. Debería darse profilaxis anti-D a las mujeres que son D negativas en estas circunstancias si el feto es D positivo o el grupo D del feto es desconocido. La citometría de flujo usa anti-D para medir una minoría de células D positivas en la sangre materna D negativa, pero la citometría de flujo no siempre es posible. También se han desarrollado técnicas que emplean anti-Hb F. Las guías del BCSH[61] proporcionan detalles completos del desarrollo y uso de estas pruebas.

Acciones recomendadas en el parto (o eventos sensibilizantes)

A todas las mujeres D negativas se les debería dar una dosis i.m. estándar de anti-D (en el músculo deltoides) en las 72 h que siguen al parto (o eventos sensibilizantes) a menos que se sepa que el bebé (o el feto) es D negativo.

De acuerdo con la prueba de Kleihauer (o equivalente), se debería administrar anti-D adicional si el volumen de la hemorragia fetomaterna excede el volumen cubierto por la anti-D estándar (fig. 20.8).

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

125 UI de inmunoglobulina anti-D son suficientes para provocar una hemorragia fetomaterna de 1 ml de células:

500 UI cubren una HFM de menos de 4 ml.

1.250 UI cubren una HFM de menos de 10 ml.

Se deberían calcular dosis adicionales empleando 125 UI por cada mililitro de células fetales y redondeando al tamaño del vial más cercano. Para hemorragias importantes se dispone de preparaciones especiales (p. ej., 2.500 UI).

Figura 20.8. **Dosificación de inmunoglobulina anti-D para cubrir la hemorragia fetomaterna (HFM) calculada[59].**

Si la hemorragia fetomaterna es de más de 4 ml, la muestra materna, si es posible, debería ser revalorada por una segunda técnica como una citometría de flujo; alternativamente, la prueba debería ser repetida en la misma muestra por un técnico diferente.

A las 48 h debería repetirse en otra muestra la prueba de Kleihauer y la detección de anticuerpos antieritrocitarios para comprobar la desaparición de las células fetales y la presencia de anti-D libre. Si aún se detectan células fetales pueden requerirse dosis adicionales de anti-D.

Las mujeres con una gran hemorragia fetomaterna deben ser evaluadas a los 6 meses posparto para ver si se ha producido sensibilización frente al antígeno D.

Enfermedad hemolítica ABO del recién nacido

La incompatibilidad ABO como resultado de un alto título de anticuerpos maternos IgG anti-A y anti-B puede causar una ictericia neonatal prolongada y anemia con esferocitosis en recién nacidos que son del grupo A o B nacidos de madres del grupo O. Debería distinguirse de la hemólisis sin esferocitosis y de la enfermedad hemolítica del recién nacido debida a otros anticuerpos antieritrocitarios. Aunque es mejor realizar las pruebas confirmatorias en sangre de cordón, a veces se produce el caso de que los recién nacidos han sido dados de alta del hospital antes de la detección del problema. En la población caucásica, aproximadamente un 15% de los casos son susceptibles de sufrir la enfermedad, aunque sólo se afecta el 1%; incluso en este caso la enfermedad es leve y raramente es tan grave como para requerir exanguinotransfusión. La enfermedad es más frecuente en las poblaciones asiáticas. Varios factores especiales se combinan para proteger al feto frente a los efectos de la incompatibilidad ABO. Estos factores son la relativa debilidad de los antígenos A y B en los eritrocitos fetales y la amplia distribución de las glucoproteínas A y B en los fluidos y tejidos fetales, que desvían en gran medida a los anticuerpos IgG maternos de los eritrocitos «diana» fetales. La enfermedad hemolítica ABO del recién nacido puede producirse en el primer embarazo incompatible, lo cual es improbable en la enfermedad hemolítica del recién nacido debida al antígeno D, donde la sensibilización se produce al final del primer embarazo y por ello el primer niño nunca resulta afectado. La predicción prenatal de la enfermedad hemolítica ABO del recién nacido no es esencial para el manejo médico porque hay tiempo para observar al bebé tras el nacimiento y tratarle de acuerdo a la gravedad de la enfermedad. No obstante, es más probable que el bebé tenga afectación si el título de anticuerpos IgG maternos anti-A (o B) supera el 1:128.

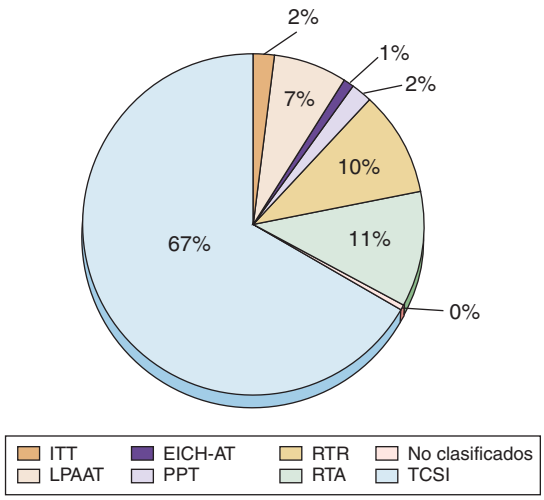


Figura 20.9. **Datos acumulados del SHOT *(Serious Hazards of Transfusion)* 2003[1,2] (n = 2.191) que muestran los diferentes tipos de eventos adversos:** TCSI, transfusión de componentes de la sangre incorrectos; ITT, infección transmitida por transfusión; LPAAT, lesión pulmonar aguda asociada a transfusión; EICH-AT, enfermedad injerto contra huésped asociada a transfusión; PPT, púrpura postransfusional; RTR, reacción transfusional retardada; RTA, reacción transfusional aguda.

Investigación serológica

La enfermedad hemolítica ABO es difícil de diagnosticar, especialmente en caucásicos, porque la prueba de la antiglobulina directa puede ser negativa o positiva débil, incluso en casos de enfermedad hemolítica grave. Además, para demostrar en el suero de la madre altos títulos de anticuerpos IgG anti-A o anti-B en presencia de anticuerpos IgM con la misma especificidad pueden requerirse pruebas especiales. Las siguientes son sugerencias útiles para hacer el diagnóstico cuando se sospecha una enfermedad hemolítica ABO del recién nacido:

1. Casi siempre está limitada a madres del grupo O, porque hay títulos de IgG anti-A y anti-B más elevados en el grupo O que en el grupo A o B.
2. Debido a que en madres del grupo O siempre hay anti-A y anti-B, la evidencia de la enfermedad hemolítica ABO del recién nacido depende de la demostración de un título elevado de IgG anti-A o anti-B, tratando el plasma/suero de la madre para eliminar los anticuerpos IgM (v. pág. 220) y entonces analizar con la técnica de la antiglobulina contra células adultas A_1, B y O.
3. La prueba de antiglobulina directa en la sangre del cordón umbilical o en una muestra del recién nacido, puede ser positiva débil o negativa; esto excluye al menos cualquier otra incompatibilidad serológica.
4. La evidencia más simple para la existencia de enfermedad hemolítica ABO del recién nacido se obtiene al ana-

lizar el plasma/suero del cordón umbilical o una muestra del recién nacido con la técnica de antiglobulina para anti-A o anti-B contra células adultas A_1, B y O. Cuanto más precozmente tras el nacimiento se realicen estas pruebas, mejor. Los retrasos conducirán a absorción de los anticuerpos y a la destrucción de los eritrocitos.

5. La mejor prueba diagnóstica para la enfermedad hemolítica ABO del recién nacido es preparar una elución de los eritrocitos del bebé y analizarla (junto con el último sobrenadante de lavado como control) con la prueba de antiglobulinas contra células adultas A_1, B y O. En algunos casos las reacciones ocurren tanto con células A_1 como con B por la presencia de anticuerpos con reacción cruzada anti-AB, aunque los casos más graves de enfermedad hemolítica ABO del recién nacido poseen anticuerpos distintos con especificidades anti-A y anti-B. La prueba con células y el último lavado control deberían ser negativas.

PRUEBAS DE COMPATIBILIDAD EN SITUACIONES TRANSFUSIONALES ESPECIALES

Neonatos y niños en los primeros cuatro meses de vida

Los niños menores de 4 meses generalmente no forman aloanticuerpos, pero pueden haber adquirido pasivamente anticuerpos maternos (v. sección de enfermedad hemolítica del recién nacido y ABO y otros antígenos de los eritrocitos).

Investigaciones en la muestra materna

Grupos ABO y D.
Detección de anticuerpos.

Investigaciones en la muestra del niño

Grupos ABO y D (sólo grupo celular), repetidos en la misma muestra si no hay grupo histórico.
Detección de anticuerpos si no se dispone de muestra de la madre.
Prueba de antiglobulina directa.

Si la prueba de antiglobulina directa es positiva o se detecta cualquier anticuerpo de eritrocitos en el suero materno o fetal, debe considerarse el diagnóstico de enfermedad hemolítica del recién nacido (v. previamente).

Selección de sangre y otros componentes

Cuando sea posible, los productos celulares escogidos deberían ser ABO y D idénticos o una alternativa compatible del grupo ABO (v. tabla 20.7). Debería tenerse cuidado si se administran productos del grupo O que contengan anti-A o anti-B a niños que no sean del grupo O. A pesar de la exclusión de donantes con elevados títulos de anti-A y anti-B para la donación de productos a este grupo, se han descrito casos de hemólisis de eritrocitos de niños del grupo A a los que se administran plaquetas del grupo O[1,2]. Los métodos actuales de producción de plasma fresco congelado eliminan cualquier resto de estroma de los eritrocitos; por ello los productos del plasma no necesitan ser D compatibles. Si la detección de anticuerpos maternos y del niño es negativa (incluyendo ausencia de IgG anti-A materna en el niño), puede administrarse sangre sin pruebas cruzadas tras determinación del grupo ABO y D, incluso tras transfusiones repetidas de pequeño volumen, porque la formación de anticuerpos antieritrocitarios es rara en niños menores de 4 meses. No es necesario repetir la detección de anticuerpos si se requieren transfusiones repetidas en los primeros 4 meses de vida[62]. En el caso de enfermedad hemolítica del recién nacido (ABO o no-ABO) o de anticuerpos maternos antieritrocitarios, se requieren pruebas cruzadas contra el plasma/suero materno empleando sangre del grupo O (que haya sido analizada y se haya demostrado que tiene bajos títulos de anti-A y anti-B) u otro grupo compatible con anticuerpos antieritrocitarios en el suero materno. Si no hay una alternativa adecuada, las células del grupo O pueden ser reconstituidas en plasma AB. Para neonatos y niños, el producto para la transfusión debería ser de menos de 5 días para exanguinotransfusión, negativo para anticuerpos de CMV, parcialmente desplasmatizado (o lavado), con Hb S negativa, deplecionado de leucocitos y K negativo. No hay necesidad de irradiar los productos a menos que al recién nacido se le haya administrado previamente una transfusión intrauterina[62].

Tabla 20.7. Elección del grupo ABO de productos sanguíneos para administración a neonatos y niños menores de 4 meses[62]

Niños	Grupo ABO del producto sanguíneo que se va a transfundir		
Grupo ABO	Eritrocitos	Plaquetas	PFC[a]
O	O	O	O
A	A o O[b]	A	A o AB
B	B o O[b]	B[c] o A o O	B o AB
AB	AB o A o B o O[b]	AB[c] o A	AB

[a] Sólo recién nacidos y niños con grupo sanguíneo O deberían recibir PFC del grupo O por los anticuerpos anti-A y anti-B, mientras que el PFC del grupo AB no contiene anticuerpos naturalmente presentes.
[b] Los productos del grupo O deben ser evaluados para detectar títulos elevados de anticuerpos anti-A y anti-B antes de ser administrados a receptores que no son de grupo O. Esto es especialmente importante para las plaquetas por el relativamente gran volumen de plasma.
[c] Puede no disponerse de plaquetas del grupo B o AB.
PFC, plasma fresco congelado.

Transfusiones intrauterinas (fetales)

La transfusión intrauterina (fetal) normalmente se lleva a cabo en una unidad especializada en medicina fetal, donde deberían existir protocolos locales. Es importante para

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

las unidades de maternidad y las unidades neonatales asociadas tener información sobre transfusiones intrauterinas previas, porque este hecho podría influir en la selección de productos sanguíneos apropiados (v. más arriba). Esto es particularmente importante cuando las unidades se encuentran en diferentes instituciones y, por lo tanto, son atendidas por diferentes departamentos transfusionales. Los protocolos asistenciales compartidos son un modo de asegurar una comunicación efectiva. Cuando se proporcionan eritrocitos para una transfusión intrauterina, deberían realizarse pruebas cruzadas con inmunoglobulinas empleando plasma/suero materno; estas pruebas deberían repetirse con una muestra fresca materna con cada transfusión. La transfusión intrauterina puede producir una hemorragia fetomaterna y con ello sensibilización a nuevos antígenos, por lo que la identificación de anticuerpos debe realizarse en todas las muestras maternas. Los eritrocitos seleccionados deberían ser del grupo O y D negativos (excepto cuando las madres han formado anti-c, en cuyo caso será necesario administrar sangre D positiva, c negativa) y K negativa. Las selecciones adicionales de fenotipos sanguíneos dependen del perfil de anticuerpos de los eritrocitos maternos. Además de las estipulaciones enumeradas previamente para la selección de sangre para los niños y neonatos, la sangre para la transfusión intrauterina debería también ser irradiada a un mínimo de 25 Gy para prevenir la enfermedad injerto contra huésped asociada a transfusión y debería ser transfundida antes de 24 h de la irradiación[62].

Pacientes que reciben transfusiones a intervalos cortos

Los pacientes que están sumamente graves, particularmente aquellos que están en unidades de cuidados intensivos o con quimioterapia intensiva para neoplasias hematológicas, pueden requerir transfusiones sanguíneas frecuentes. Esta sección no contempla las transfusiones a neonatos y niños en los primeros cuatro meses de vida (v. previamente) y para receptores de trasplantes de células madre (v. más adelante) son necesarias otras consideraciones especiales.

Los aloanticuerpos pueden desarrollarse rápidamente tras una transfusión. Por ello, se debería obtener una muestra para pruebas de compatibilidad antes de cada transfusión si se realizan a intervalos de 3 o más días. No se necesitan muestras diarias, pero se recomienda una detección de anticuerpos al menos cada 72 h por ser útil y seguro.

Programas de transfusiones crónicas

Los pacientes con β-talasemia mayor o fracaso adquirido de la médula ósea son ejemplos de pacientes en los que se toma la decisión de que requieren transfusiones regulares. Es importante establecer un plan de tratamiento para cada paciente con desencadenante claro para la transfusión y hacer controles regulares de los efectos adversos de la transfusión incluyendo la sobrecarga de hierro. El riesgo de desarrollar aloanticuerpos frente a antígenos de los eritrocitos de la sangre transfundida influye en el intervalo entre las muestras de sangre (v. tabla 20.8). Si se hace un enfoque menos riguroso de un paciente en el que las transfusiones repetidas no han conducido a formación de aloanticuerpos, el clínico y el departamento de transfusiones deberían tomar una decisión mutua tras una cuidadosa consideración de los riesgos.

El fenotipo Rh pretransfusional permite emparejamientos para D, C, c, E y e. Algunos grupos étnicos tienen con frecuencia el fenotipo cDe (R_0) y podría ser difícil encontrar sangre D positiva, negativa para C y E, particularmente si hay otros anticuerpos antieritrocitarios. En esta situación se selecciona sangre D negativa. Adicionalmente, en los pacientes con hemoglobinopatías debería disponerse de un fenotipo de eritrocitos extendido, antes de su primera transfusión, para incluir los antígenos K, Jk^a, Jk^b, Fy^a, Fy^b, M, N, S y s[63]. Éste podría ser usado para seleccionar sangre, pero resulta también útil cuando se realizan estudios de los anticuerpos formados como resultado de las transfusiones repetidas. Aunque el suministro de eritrocitos con el fenotipo ampliado es asumido por algunas unidades que tratan las hemoglobinopatías[64], el grado de ampliación depende de los recursos y no debería dificultar la entrega de un soporte transfusional efectivo. No hay suficientes indicios de la conveniencia de hacer esta recomendación a otros pacientes que son transfundidos crónicamente.

Trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas

Un trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas puede introducir un nuevo grupo sanguíneo: un antígeno ABO (incompatibilidad mayor), anticuerpos ABO (incompatibilidad menor) o ambos. La pareja receptor/donante tiene diferentes grupos ABO y D en alrededor del 15-20% de trasplantes de células madre de hermanos, y esto es más común aún en el trasplante de células madre de donantes no emparentados. Si hay una incompatibilidad ABO mayor y las aloaglutininas persisten en el plasma del receptor, el injerto puede producir una prueba de antiglobulina directa po-

Tabla 20.8. Tiempos de obtención de las muestras de compatibilidad pretransfusional en los pacientes con transfusiones repetidas[a]

Pacientes transfundidos en	Muestra tiene que ser obtenida
3–14 días	Antes de 24 h después de la transfusión
15–28 días	Antes de 72 h después de la transfusión
29 días a 3 meses	Antes de 1 semana después de la transfusión

[a] De la guía de compatibilidad del British Committee for Standards in Haematology[9] y a partir de los datos de reacciones transfusionales hemolíticas retardadas en *Serious Hazards of Transfusion*.

sitiva cuando un número sustancial de eritrocitos del donante se incorporan a la circulación y puede ocurrir cierto grado de hemólisis.

Una *incompatibilidad ABO menor* se produce cuando el donante tiene anticuerpos frente a los eritrocitos del receptor (p. ej., donante 0, receptor A). Transfundir eritrocitos sin plasma del grupo ABO del donante hasta que los eritrocitos propios del receptor no sean ya detectables.

Una *incompatibilidad ABO mayor* se produce cuando el receptor tiene anticuerpos frente a los eritrocitos del donante (p. ej., donante A, receptor 0). Transfundir eritrocitos del grupo del paciente hasta que no se detecten anticuerpos frente a eritrocitos por la prueba de antiglobulina indirecta y la prueba de antiglobulina directa sea negativa, y entonces transfundir del grupo del donante.

Una *incompatibilidad mayor y menor* se produce cuando hay anticuerpos frente a los eritrocitos del receptor y del donante (p. ej., donante A, receptor B). Transfundir eritrocitos del grupo O hasta que los anticuerpos frente a eritrocitos del receptor no sean detectables por una prueba de la antiglobulina indirecta y la prueba de antiglobulinas directa sea negativa.

Antes de realizar el trasplante, se administran eritrocitos del grupo del paciente, plaquetas y plasma fresco congelado, pero tras el injerto, la elección del producto sanguíneo depende del desequilibrio ABO y D entre la pareja donante/receptor[9]. Para un receptor D positivo con un donante D negativo, deberían usarse componentes D negativo.

Desde el momento del acondicionamiento, hasta el período de profilaxis de la enfermedad injerto contra el huésped, todos los productos sanguíneos celulares deberían ser irradiados. Las células madre antes de ser reinfundidas son purgadas de eritrocitos para prevenir una reacción transfusional hemolítica aguda.

ESTUDIO DE UNA REACCIÓN TRANSFUSIONAL

Los efectos adversos relacionados con la transfusión pueden ser agudos (dentro de las 24 h) o retardados (v. tabla 20.9). Los bancos de sangre deberían ser inmediatamente informados si se sospecha una reacción transfusional, siendo idealmente encargados de una investigación coordinada, para comunicarse con los clínicos y los servicios transfusionales, y para aconsejar sobre la elección apropiada de productos sanguíneos para transfusiones posteriores. Los efectos adversos graves deberían ser comunicados confidencialmente al plan nacional de hemovigilancia, al banco de sangre local y al comité de transfusiones del hospital. Las reacciones transfusionales agudas son más fáciles de atribuir a la transfusión que las reacciones retardadas, aunque en pacientes que ya están muy enfermos, pueden no diagnosticarse. Los síntomas y signos de una reacción transfusional aguda son similares sin importar la causa; el tratamiento e investigación de la causa son simultáneos. Es más fácil distinguir entre la causa de reacciones transfusionales tardías, pero puede ser más difícil de reconocer su relación con el episodio de transfusión por el retraso en su aparición. Las siguientes ideas resumen el papel del laboratorio en la investigación y manejo de las reacciones transfusionales, y en el *Handbook of Transfusion Medicine* puede encontrarse un algoritmo muy útil[64].

Tabla 20.9. Tipos de reacciones transfusionales

Reacciones transfusionales agudas	Reacciones transfusionales retardadas
Reacción hemolítica aguda	Reacción hemolítica retardada
Anafilaxis	Infección transmitida por transfusión
Contaminación bacteriana de productos sanguíneos	Enfermedad injerto contra el huésped asociada a transfusión
Lesión pulmonar aguda asociada a transfusión	Púrpura postransfusional
Sobrecarga aguda de líquidos	Sobrecarga de hierro
Reacción alérgica	Inmunosupresión
Reacción transfusional febril no hemolítica	—

Reacciones transfusionales agudas

Las reacciones agudas con peligro para la vida pueden deberse a las siguientes causas:

1. Hemólisis intravascular aguda debido a incompatibilidad ABO.
2. Hemólisis intravascular aguda que puede ocurrir, aunque raramente, como resultado de otros anticuerpos antieritrocitarios que activan el complemento a través del complejo de ataque a la membrana (p. ej., anti-Vel y anti-PP_1P^k).
3. Hemólisis extravascular grave. Puede ocurrir cuando un anticuerpo potente, que no se une al complemento o sólo se une a la fase C3, no es percibido en las pruebas pretransfusionales y causa aclaramiento extravascular rápido de eritrocitos incompatibles transfundidos. Estas reacciones son normalmente menos graves que las causadas por incompatibilidad ABO.
4. Anafilaxis y reacciones alérgicas agudas graves. Éstas se asocian con mayor frecuencia a productos sanguíneos que contienen grandes cantidades de plasma cuando el receptor ha estado presensibilizado a un alergeno del plasma del donante. Los receptores con déficit de IgA pueden desarrollar anticuerpos frente a IgA.
5. Transfusión de un producto sanguíneo infectado. Esto es más frecuente con plaquetas porque se almacenan a temperatura ambiente. Si se prueba la contaminación, se debe informar al banco de sangre para que puedan examinarse otros componentes del mismo donante.
6. La reacción pulmonar aguda relacionada con la transfusión es una enfermedad respiratoria aguda, uno de cuyos mecanismos es la transferencia pasiva de anti-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

cuerpos de la unidad de sangre que reaccionan con los leucocitos del receptor, produciendo un edema pulmonar intersticial no cardiogénico.

Aunque rara, la aparición de una reacción transfusional aguda es normalmente muy dramática para el paciente muy grave. El tratamiento está dirigido a la reanimación del paciente y a la determinación de la causa para intentar prevenir cualquier incidente adicional (tabla 20.10). Además, durante la transfusión pueden producirse reacciones desagradables aunque sin peligro para la vida. Entre ellas se incluyen las siguientes:

1. *Reacciones alérgicas*. Una leve urticaria o picor causados por una reacción a proteínas del plasma de la unidad de sangre.
2. *Reacción transfusional febril no hemolítica*. Los anticuerpos del receptor reaccionan con los glóbulos blancos del donante y causan un aumento de la temperatura no superior a 1 °C; alternativamente, la liberación de citocinas de los glóbulos blancos de la unidad donada puede causar una reacción similar. Estas circunstancias normalmente condicionan un enlentecimiento de la transfusión y administración de antipiréticos y antihistamínicos. No requieren investigación más detallada.

Hemólisis intravascular aguda

Los eritrocitos transfundidos reaccionan con los anti-A y anti-B propios del paciente y los eritrocitos son destruidos en la circulación causando colapso, fracaso renal y coagulación intravascular diseminada. La transfusión de células con incompatibilidad ABO generalmente se debe a un error de identificación. Esto puede ocurrir al extraer la muestra de sangre o al etiquetarla (sangre errónea en el tubo), en las pruebas de laboratorio (error técnico), con el etiquetado de la unidad de sangre (error administrativo) y en la retirada de sangre de la nevera, o con una inadecuada comprobación a la cabecera de la cama. Si los eritrocitos son transfundidos por error al paciente equivocado, hay aproximadamente 1 de 3 posibilidades de que se produzca la incompatibilidad ABO. La reacción es más grave si se transfunde sangre del grupo A a un paciente del grupo 0, y se requieren sólo unos pocos mililitros de eritrocitos para causar esta reacción. La actuación precoz en el reconocimiento de esta emergencia aguda y la detención de la transfusión puede conseguir un mejor resultado, porque la gravedad depende del volumen de sangre transfundido. Si se sospecha una reacción transfusional aguda, el laboratorio debe ser informado inmediatamente y la unidad de sangre y el equipo de administración deben ser devueltos al laboratorio con muestras de sangre y orina del paciente (tabla 20.10).

Control de la documentación

La identificación del paciente, el impreso de compatibilidad y la tarjeta de compatibilidad de la unidad de sangre deberían ser comprobadas de nuevo a la cabecera del paciente. Cualquier discrepancia debe ser notificada al banco de sangre inmediatamente. Si se ha administrado sangre errónea, las unidades reservadas para el paciente deben ser retiradas de la circulación para prevenir otro error paralelo que se produzca en otro paciente que pueda tener el mismo nombre o similar.

Investigaciones serológicas

Las investigaciones serológicas tienen un doble propósito: *a)* comprobar cualquier error del laboratorio en la muestra

Tabla 20.10. Investigaciones inmediatas en caso de una reacción transfusional aguda

Evaluación para comprobar si existe hemólisis
Realizar un examen visual del plasma y la orina del paciente (puede evaluarse la hemoglobina en plasma y orina, pero no es esencial)
Frotis sanguíneo que mostrará esferocitosis, fragmentación de eritrocitos
Los niveles de bilirrubina y lactato deshidrogenasa (LDH) estarán aumentados
Evaluación para buscar una posible incompatibilidad
Comprobar la documentación y la identidad del paciente
Repetir el grupo ABO del paciente pretransfusional y postransfusional y de la(s) unidad(es) del donante
Detección de anticuerpos antieritrocitarios pretransfusionales y postransfusionales del paciente
Repetir las pruebas cruzadas con muestras pretransfusionales y postransfusionales
Prueba de antiglobulina directa (PAD) del paciente
Realizar una elución de los eritrocitos del paciente si el PAD es positivo
Evaluación de la coagulación intravascular diseminada
Realizar un hemograma y frotis, pruebas de coagulación y productos de degradación de la fibrina (o dímero-D)
Evaluación de la función renal
Evaluación de urea, creatinina y electrolitos en sangre
Evaluación de infecciones bacterianas
Obtener hemocultivos del paciente y la unidad de sangre incluyendo una tinción de Gram inmediata
Investigaciones inmunológicas
Evaluar los niveles de inmunoglobulina A (IgA) y anticuerpos anti-IgA

pretransfusional de comprobación del grupo y compatibilidad, y *b)* repetir el grupo y las pruebas de compatibilidad con la muestra postransfusional para ver si la muestra pretransfusional era del paciente correcto. Las reacciones de las pruebas en fase líquida deberían leerse al microscopio para detectar cualquier reacción de campo mixto.

Pruebas de hemólisis

Dado que no todas las reacciones transfusionales se deben a hemólisis, se requieren pruebas hematológicas y bioquímicas así como inspección visual del plasma/suero y de la orina (v. cap. 9). Pueden requerirse pruebas adicionales para orientar la reanimación del paciente y dirigir el uso de productos sanguíneos para tratar la coagulación intravascular diseminada.

Pruebas microbiológicas

Si la causa de la reacción transfusional aguda no está todavía clara, deberían obtenerse cultivos de sangre de la bolsa de sangre y del paciente. Los bancos de sangre emiten guías para la investigación de unidades potencialmente contaminadas.

Reacciones transfusionales hemolíticas retardadas

Una reacción transfusional hemolítica retardada se produce cuando el receptor ha sido inmunizado a un antígeno de los eritrocitos por una transfusión previa o durante el embarazo, pero el anticuerpo se encuentra a niveles bajos o indetectables. Se desencadena una respuesta inmune frente al antígeno incompatible que ha sido transfundido. Los eritrocitos recubiertos con IgG y/o complemento son destruidos en el bazo y el hígado. Los anticuerpos Kidd están a menudo implicados en las reacciones transfusionales retardadas, pero son difíciles de detectar, a menudo manifestando un efecto dosis, disminuyen rápidamente a niveles indetectables y están frecuentemente presentes en combinaciones de anticuerpos.

Investigaciones hematológicas

Los siguientes hechos sugieren una reacción transfusional hemolítica retardada:

1. Descensos de la concentración de hemoglobina más rápidos de lo esperado tras una transfusión de eritrocitos.
2. Incrementos de la concentración de hemoglobina menores de lo esperado por el número de unidades transfundidas.
3. Frotis sanguíneo en que se observa esferocitosis.
4. Prueba de antiglobulinas positiva directa.
5. Aumento de la bilirrubina no conjugada.

Investigaciones serológicas

Es deseable tener una muestra pretransfusional disponible para evaluar adicionalmente la muestra postransfusional, pero esto no siempre es posible por el retraso entre el momento de la transfusión y el estudio. Se ha recomendado que se conserven algunas muestras de plasma/suero de todos los pacientes que son transfundidos, pero esto no es siempre útil. A menos que la reacción sea aguda, la unidad transfundida no estará disponible para la reevaluación. En el Reino Unido, el fenotipo de cada unidad es proporcionado por el National Blood Service, y esta información puede ayudar en la investigación de una reacción transfusional retardada. Las siguientes pruebas deben ser realizadas preferiblemente usando técnicas diferentes o más sensibles:

1. Confirmar el grupo ABO y D de los pacientes en una muestra pretransfusional y postransfusional.
2. Realizar una prueba de la antiglobulina directa con los eritrocitos lavados del paciente pretransfusionales y postransfusionales. En caso de una prueba de antiglobulina directa positiva, la elución del anticuerpo puede ayudar a la identificación o confirmación de especificidades en caso de que no se trate de una incompatibilidad ABO.
3. Repetir las pruebas cruzadas, si es posible, usando muestras pretransfusionales y postransfusionales.
4. Evaluación de las muestras pretransfusionales y postransfusionales para anticuerpos antieritrocitarios e identificación de cualquier anticuerpo. La muestra postransfusional inmediata podría no tener anticuerpos antieritrocitarios detectables, aunque podrían ser obtenidas por elución de los eritrocitos del paciente si la prueba de antiglobulinas directa es positiva. También es posible tener una reacción transfusional hemolítica retardada con una prueba de antiglobulina directa negativa, porque los eritrocitos cubiertos con anticuerpos han sido eliminados de la circulación. Si la investigación postransfusional inmediata no es concluyente, repetir las pruebas 10 días más tarde para permitir el incremento de los niveles de anticuerpos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Serious Hazards of Transfusion (SHOT). Annual reports 1996-2003: www.shot-uk.org.
2. Serious Hazards of Transfusion Annual Report 2003 ISBN 0-9532-789-6-4.
3. British Committee for Standards in Haematology (BCSH). Guidelines available at www.bcshguidelines.com/.
4. AABB (previously American Association of Blood Banks): www.aabb.org.
5. Faber J-C 2004 The European Blood Directive: a new era of blood regulation has begun. Transfusion Medicine 14:257-273.
6. Department of Health. Better blood transfusion. Health Service Circular 1998/224.
7. Department of Health. Better blood transfusion 2. Health Service Circular 2002/009.
8. Annual Reports of UK National External Quality Assessment Scheme (Blood Transfusion Laboratory Practice); contact scheme via www.ukneqas.org.uk/Directory/HAEM/bgs.htm.
9. British Committee for Standards in Haematology 2004 Guidelines for compatibility procedures in blood transfusion laboratories. Transfusion Medicine 14:59-73.
10. British Committee for Standards in Haematology 1999 The

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

administration of blood and blood components and the management of transfused patients. Transfusion Medicine 9:227-238.
11. Murphy MF, Stearn BE, Dzik WH 2004 Current performance of patient sample collection in the UK. Transfusion Medicine 14:113-121.
12. Brecher ME 2002. AABB Technical manual. 14th ed. AABB, Bethesda MD20814-2749.
13. Report of the Working Party of the Royal College of Pathologists and the Institute of Biomedical Science 1999 The retention and storage of pathological records and archives. 2nd ed. (corrected 2003); available at www.rcpath.org.
14. Transfusion transmission of HCV infection before anti-HCV testing of blood donations in England: results of the national HCV lookback program. 2002 Transfusion 42:1146-1153.
15. British Committee for Standards in Haematology 2000 Guidelines for blood bank computing. Transfusion Medicine 10:307-314.
16. Information for patients needing irradiated blood products. NHS INF/PCS/MS/001/03 or available at www.blood.co.uk/hospitals/library/pi/index.htm.
17. Lau FY, Cheng G 2001 To err is human nature: can transfusion errors due to human factors ever be eliminated? Clinical Chimica Acta 313:59-67.
18. Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Working Party of the ISBT 2003 An international study of the performance of sample collection from patients. Vox Sanguinis 85:40-47.
19. Scott ML, Voak D 2000 Monoclonal antibodies to Rh D: development and uses. Vox Sanguinis 78(suppl 2):79-82.
20. Jones J, Scott ML, Voak D 1995 Monoclonal anti-D specificity and Rh D structure: criteria for selection of monoclonal anti-D reagents for routine typing of donors. Transfusion Medicine 5:171-184.
21. Roback JD, Barclay S, Hillyer CD 2003 An automatable format for accurate immunohematology testing by flow cytometry. Transfusion 43:918-927.
22. BCSH Blood Transfusion Task Force 1990 Guidelines for microplate techniques in liquid-phase blood grouping and antibody screening: a joint publication of the British Society for Haematology and the British Blood Transfusion Society. Clinical and Laboratory Haematology 12:437-460.
23. Horn KD 1999 The classification, recognition and significance of polyagglutination in transfusion medicine. Blood Reviews 13:36-44.
24. Garratty G, Arndt P, Co A, et al 1996 Fatal haemolytic transfusion reaction resulting from ABO mistyping of a patient with acquired B antigen detectable only by some monoclonal anti-B reagents. Transfusion 36:351-357.
25. Knowles SM, Milkins CE, Chapman JF, et al 2002 The United Kingdom National External Quality Assessment Scheme (Blood Transfusion Laboratory Practice): trends in proficiency and practice between 1985 and 2000. Transfusion Medicine 12:11-23.
26. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M 1997 Blood transfusion in clinical medicine. 10th ed. Blackwell Science Ltd, Oxford.
27. Garratty G 2002 Screening for RBC antibodies—what should we expect from antibody detection RBCs. Immunohaematology 18:71-77.
28. Issitt PD, Combs MR, Bredehoeft SJ et al 1993 Lack of clinical significance of "enzyme-only" red cell alloantibodies. Transfusion 33:284-293.
29. Shirey RS, Boyd JS, Ness PM 1994 Polyethylene glycol versus low-ionic-strength solution in pre-transfusion testing: a blinded comparison study. Transfusion 34:368-370.
30. MDA Evaluation report MDA/96/14. Six systems for the detection of red cell antibodies. MHRA, Hannibal House, London SE1 6TQ.
31. Bromilow IM, Eggington JA, Owen GA, et al 1993 Red cell antibody screening and identification: a comparison of two column technology methods. British Journal of Biomedical Science 50:329-333.
32. Phillips P, Voak D, Knowles S et al 1997 An explanation and the clinical significance of the failure of microcolumn tests to detect weak ABO and other antibodies. Transfusion Medicine 7:47-53.
33. Cummins D, Downham B 1994 Failure of DiaMed-ID microtyping system to detect major ABO incompatibility. Lancet 343:1649-1650.
34. Voak D, Downie DM, Haigh T, et al 1982 Improved antiglobulin tests to detect difficult antibodies: detection of anti-K by LISS. Medical Laboratory Science 39:363-370.
35. British Committee for Standards in Haematology1990 Guidelines for implementation of a maximum surgical blood order schedule. Cinical and Laboratory Haematology 12: 321-327.
36. Contreras M, Hazlehurst GR, Armitage SE 1983 Development of "auto-anti-A1antibodies" following alloimmunisation in an A2 recipient. British Journal of Haematology 55:657-663
37. O'Hagan J, White J, Milkins CE, et al 1999 Direct agglutination crossmatch at room temperature (DRT): the results of a NEQAS (BTLP) questionnaire. Transfusion Medicine 9 (Suppl 1):42.
38. Lamberson RD, Boral LI, Berry-Dortch S 1986 Limitations of the crossmatch for detection of incompatibility between A_2B red blood cells and B patient sera. American Journal of Clinical Pathology 86:511-513.
39. Shulman IA, Odono V 1994 The risk of overt acute hemolytic transfusion reaction following the use of an immediate-spin crossmatch. Transfusion 34:87-88.
40. Berry-Dortch S, Woodside CH, Boral LI 1985 Limitations of the immediate spin crossmatch when used for detecting ABO incompatibility. Transfusion 25:176-178.
41. AABB 2003 Guidelines for implementing the electronic crossmatch.
42. Säfwenberg J, Högman CF, Cassemar B 1997 Computerized delivery control—a useful and safe complement to the type and screen compatibility testing. Vox Sanguinis 72:162-168.
43. Chapman JF, Milkins C, Voak D 2000 The computer crossmatch: a safe alternative to the serological crossmatch. Transfusion Medicine 10:251-256.
44. Judd WJ 1998 Requirements for the electronic crossmatch. Vox Sanguinis 74(suppl 2):409-417.
45. Stainsby D, Murphy MF [for the National Blood Service Transfusion Medicine Clinical Policies Group] 2003 Guidelines for the use of group O D negative red cells including contingency planning for large scale emergencies. www.blood.co.uk/hospitals/guidelines/index.htm.
46. Stainsby D, MacLennan S, Hamilton PJ 2000 Management of massive blood loss: a template guideline. British Journal of Anaesthetics 85:487-491.
47. Daniels G, Hadley A, Green CA 2003 Causes of fetal anemia in haemolytic disease due to anti-K. Transfusion 43:115-116.

48. Bowman J 1997 The management of hemolytic disease in the fetus and newborn. Seminars in Perinatology 21:39-44.
49. British Committee for Standards in Haematology 1996 Guidelines for blood grouping and red cell antibody testing during pregnancy. Transfusion Medicine 6:71-74.
50. British Committee for Standards in Haematology 1999 Addendum for guidelines for blood grouping and red cell antibody testing during pregnancy. Transfusion Medicine 9: 99.
51. Van Dijk BA, Dooren MC, Overbeeke MA 1995 Red cell antibodies in pregnancy: there is no "critical titre." Transfusion Medicine 5:199-202.
52. Daniels G 2004 Molecular blood grouping. Vox Sanguinis 87(suppl 1):S63-S66.
53. Daniels G 2002 Human blood groups. 2nd ed., Blackwell Publishing, Oxford.
53. Kumar S, O'Brien A 2004 Recent developments in fetal medicine. British Medical Journal 328:1002-1006.
54. Finning K, Martin P, Daniels G 2004 A clinical service in the UK to predict fetal Rh (Rhesus) D blood group using free fetal DNA in maternal plasma. Annals of the New York Academy of Science 1022:119-123.
55. Urbaniak SJ, Greiss MA 2000 RhD haemolytic disease of the fetus and the newborn. Blood Reviews 14:44-61.
56. Moise KJ 2002 Management of Rhesus alloimmunisation in pregnancy. Obstetrics and Gynecology 100:600-611.
57. Hadley AG 1998 A comparison of in vitro tests for predicting the severity of haemolytic disease of the fetus and newborn. Vox Sanguinis 74(suppl 2):375-383.
58. Abdel-Fattah SA, Soothill PW, Carroll SG, et al 2002 Middle cerebral artery Doppler for the prediction of fetal anaemia in cases without hydrops: a practical approach. British Journal of Radiology 75:726-730.
59. Lee D, Contreras M, Robson SC et al 1999 Joint Working Group of the British Blood Transfusion Society and the Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. Use of anti-D immunoglobulin for Rh prophylaxis (Green top Guideline No 22—revised 2002) Transfusion Medicine 9:93-97. Also available at www.rcog.org.uk.
60. National Institute for Clinical Excellence 2002 Pregnancy - routine anti-D prophylaxis for rhesus negative women. Technology Appraisal No. 41. April 2002 www.nice.org.uk.
61. British Committee for Standards in Haematology1999 The estimation of fetomaternal hemorrhage. Transfusion Medicine 9:87-92.
62. British Committee for Standards in Haematology 2004 Transfusion guidelines for neonates and older children. British Journal of Haematology 124:433-453.
63. British Committee for Standards in Haematology 2003 Management of acute painful crisis in sickle cell disease. British Journal of Haematology 120:744-752.
64. Vichinsky EP, Luban NLC, Wright E et al Stroke prevention trial in sickle cell anaemia. Transfusion 41:1086-1092.
65. McClelland DBL2001 Handbook of transfusion medicine, 3rd ed. Blood Transfusion Services of the United Kingdom, London: The Stationery Office.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

21 Análisis molecular y citogenético

Tom Vulliamy y Jaspal Kaeda
Con la contribución de Barbara J. Bain

Introducción al análisis de ADN 477
Extracción de ADN 478
Reacción en cadena de la polimerasa 478
Análisis de los productos de la reacción en cadenade la polimerasa 479
Presencia o ausencia de un producto de la reacción en cadena de la polimerasa 479
Tamaño del producto de la PCR 480
Digestión con enzimas de restricción 481
Hibridación con oligonucleótidos específicos de alelo 481
Investigación de las hemoglobinopatías 481
Enfermedad de células falciformes 481
Talasemia β 482
Talasemia α 482
Trastornos de la coagulación 483
Trombofilia 483
Leucemia y linfoma 485
Principios citogenéticos y terminología 485
Hibridación por fluorescencia *in situ* 488
Translocaciones, análisis molecular y enfermedad mínima residual 489
Reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa BCR-ABL 490
Monitorización de la enfermedad mínima residual 490
Trastornos linfoproliferativos 494
Estudios de quimerismo donante-receptor 496
Déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 496
Apéndices: métodos técnicos 497
Apéndice A. Extracción del ADN genómico 497
Apéndice B. Reacción en cadena de la polimerasa 499
Apéndice C. Electroforesis en gel de poliacrilamida 501
Apéndice D. Digestión con enzimas de restricción de productos de la reacción en cadena de la polimerasa 502
Apéndice E. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa 502
Apéndice F. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real 504
Glosario 507

INTRODUCCIÓN AL ANÁLISIS DE ADN

El análisis de ADN está desempeñando un papel de creciente importancia en el refinamiento del diagnóstico hematológico y en las decisiones sobre el tratamiento. En los últimos años nuestra comprensión de las bases moleculares tanto de los trastornos hematológicos heredados como de los adquiridos ha mejorado de forma considerable. Hay varios modos en que este conocimiento se está aplicando en el momento actual al diagnóstico hematológico. Entre ellos se incluye la identificación de familias con riesgo de presentar hemoglobinopatías, lo que permite la realización de un diagnóstico prenatal precoz, la evaluación de factores de riesgo genéticos en la trombofilia, el diagnóstico y la caracterización de las leucemias, la monitorización de la enfermedad mínima residual y el estudio del quimerismo donante-receptor tras el trasplante de médula ósea.

En este capítulo describiremos algunos de los métodos que pueden aplicarse en estas situaciones, aunque esta revisión no puede ser exhaustiva y reflejará los intereses de nuestro laboratorio. Los siguientes puntos deberían ayudar a comprender los métodos descritos:

1. La información para la producción de proteínas está codificada por cuatro bases: adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T). Estas bases se encuentran distribuidas a lo largo de la «columna vertebral» de azúcares con ácido fosfórico que conforma la molécula de ADN.
2. El ADN que se encuentra en el núcleo de todas las células eucariotas es una molécula de doble cadena.
3. Las dos cadenas están unidas por puentes de hidrógeno, de forma específica entre los residuos de A y T, y entre los residuos de G y C.
4. Debido a esto, la secuencia de bases en una cadena de la molécula de ADN (p. ej., TAGGCTAG) sólo tiene una posible pareja en la otra cadena (ATCCGATC). Estas secuencias se denominan complementarias.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

5. Las cadenas presentan polaridad; un extremo es llamado extremo 5′, y el otro es el extremo 3′. Las dos cadenas corren en direcciones opuestas (esto es, son antiparalelas).

La capacidad para manipular el ADN como moléculas recombinantes fue consecuencia del descubrimiento de las enzimas bacterianas modificadoras de ADN, en concreto de las enzimas de restricción. Éstas son endonucleasas que cortan las moléculas de ADN siempre que se presenta una secuencia de bases específica y corta. Actualmente se han comercializado más de 100 enzimas de restricción diferentes. Utilizando estas enzimas es posible cortar el material genético de los núcleos celulares humanos (el genoma humano) en fragmentos específicos de un tamaño manejable. Con las enzimas modificadoras de ADN necesarias, estos fragmentos de restricción pueden insertarse en vectores de clonación como plásmidos o cósmidos. Las bacterias que alojan estos vectores pueden aislarse en forma de colonias y propagarse de forma indefinida a continuación.

De esta forma, los genes pueden ser aislados como moléculas de ADN recombinante clonadas, y puede establecerse su secuencia de ADN. El clonado y la secuenciación del genoma humano están prácticamente completados[1,2]. Para casi todos los genes humanos se conocen las secuencias expresadas, clonadas como ADN complementarios (ADNc). Este colosal aumento de información sobre la secuenciación que se ha obtenido en los últimos años se ha hecho accesible gracias al desarrollo paralelo de la tecnología informática. La capacidad de amplificar fragmentos de ADN específicos a partir de pequeñas cantidades de material de partida mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)[3] se ha convertido en la base de la mayoría de los análisis de ADN. Debido a que esta técnica es relativamente simple, rápida y barata y requiere sólo algunas piezas básicas de equipamiento de laboratorio, ha abierto el campo de la genética molecular, permitiendo el acceso al diagnóstico molecular lejos de los centros especializados.

Se dispone de muchos protocolos alternativos para la manipulación del ADN, y un manual de laboratorio exhaustivo que describe las técnicas de biología molecular llega a ocupar tres volúmenes[4]. Las guías de la American Association for Molecular Pathology abordan la selección y desarrollo de las técnicas diagnósticas apropiadas, control de calidad y validación e implementación de las pruebas diagnósticas moleculares[5]. En el Reino Unido se ha aprobado un esquema de evaluación de calidad, externo y nacional, para analizar la genética molecular de la trombofilia, y está en desarrollo un estudio piloto sobre el diagnóstico mediante ADN de las hemoglobinopatías. Es cierto, sin embargo, que el desarrollo y la implementación de métodos de control de calidad y de estándares de seguridad todavía presentan cierto atraso con respecto a la rápida expansión de las técnicas moleculares[6,7]. En este capítulo se describen algunas de las aplicaciones de la PCR en un laboratorio de diagnóstico hematológico. Por las razones que se acaban de mencionar, el análisis mediante PCR ha prevalecido en gran medida por encima de otras técnicas, incluyendo el análisis mediante el método de la mancha de Southern *(Southern blot)*. Existen situaciones en que este último resulta aún adecuado; para obtener información al respecto, se remite al lector a ediciones previas de este libro.

EXTRACCIÓN DE ADN

El ADN puede ser extraído de cualquier muestra sanguínea o tisular. La calidad y cantidad del ADN obtenido variará dependiendo del tamaño, la edad y el recuento celular de la muestra. Como regla general, 3 ml de sangre en EDTA bastarán (v. pág. 5). El ADN es extraído de todas las células nucleadas y se denomina ADN genómico.

En el núcleo, el ADN se encuentra firmemente unido a muchas proteínas diferentes en forma de cromatina. Es importante eliminar tanto éstas como otras proteínas celulares para extraer el ADN. Esto se consigue a través de la utilización de solventes orgánicos o de la precipitación con sales. Se obtiene así una solución acuosa, de la cual el ADN es posteriormente purificado mediante precipitación con etanol. El método descrito en el apéndice A de la página 497 produce un ADN de suficiente calidad para realizar todos los análisis de rutina[8].

Se dispone actualmente de varios equipos para extracción de ADN. Pueden reducir significativamente el tiempo necesario para realizar la extracción de ADN, evitando el uso de solventes orgánicos y con un buen control de calidad de los reactivos utilizados. Sin embargo, el uso de equipos en todos los aspectos de la biología molecular puede dificultar el progreso de las técnicas[4].

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

El desarrollo de la PCR[3] ha producido un extraordinario impacto en el estudio y análisis de los ácidos nucleicos. Mediante el uso de una ADN polimerasa termoestable, la Taq polimerasa, extraída de la bacteria *Thermus aquaticus*, la PCR produce la amplificación de un fragmento específico de ADN de forma que pueda ser visualizado mediante la tinción con bromuro de etidio sobre un gel de agarosa. El procedimiento lleva sólo unas pocas horas, no requiere la utilización de radionucleótidos y sólo necesita una muy escasa cantidad de material de partida.

Principio

Una ADN polimerasa sintetizará la cadena complementaria de un ADN molde *in vitro*. Para que pueda iniciarse la síntesis se requiere un fragmento de ADN de doble cadena. Esta secuencia puede generarse mediante el alineamiento de un oligonucleótido (oligo), que es una molécula de ADN de cadena única, corta, de entre 17 y 22 bases de longitud, a un molde de ADN de cadena única. Estos oligos, que son sintetizados *in vitro*, iniciarán la síntesis de ADN y en consecuencia son denominados «cebadores».

En la PCR se utilizan al menos 2 oligos. Uno inicia la síntesis de ADN hacia delante, esto es, a lo largo de la cadena codificadora de ADN, mientras que el otro inicia la síntesis

de ADN en dirección inversa, o a lo largo de la cadena no codificadora. Los otros componentes de la reacción son el molde de ADN del que el fragmento de ADN será amplificado, los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) requeridos como los ladrillos de construcción del ADN que va a ser sintetizado, el tampón necesario y la ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa).

El primer paso de la reacción es desnaturalizar el molde de ADN calentando la mezcla reactiva a 95 °C. Después, la reacción es enfriada a una temperatura, habitualmente entre 50 y 65 °C, que permite el alineamiento de los oligos al molde de ADN pero sólo en sus secuencias complementarias específicas. La temperatura se eleva a continuación a 72 °C, temperatura a la que la Taq polimerasa sintetiza ADN de forma eficiente, realizando la extensión del oligo en la dirección 5′-3′. La repetición cíclica de los pasos de desnaturalización, hibridación y extensión, mediante el simple cambio de la temperatura de la reacción en un bloque térmico automatizado, resulta en la amplificación exponencial del ADN comprendido entre los dos oligos (fig. 21.1).

La especificidad del fragmento de ADN que es amplificado viene consiguientemente determinada por las secuencias de oligos utilizadas. Una secuencia de 17 pares de bases (pb) es en teoría única en el genoma humano y, por tanto, los oligos de esta longitud y mayores se hibridarán en un único punto específico sobre un molde de ADN genómico. Por tanto, un requisito general de la PCR es tener algún conocimiento de la secuencia de ADN del gen que va a ser amplificado. La posición relativa de los dos oligos es otra consideración importante. Deben iniciar la síntesis de ADN en direcciones opuestas pero apuntando uno hacia el otro. También existe un límite máximo de distancia a la que los oligos pueden colocarse; pueden amplificarse fragmentos de varios pares de kilobases (kb), pero el proceso es más eficiente con fragmentos de varias centenas de pb.

Reactivos y métodos

Véase el apéndice B, página 499.

Problemas e interpretación

Si la amplificación ha tenido éxito, se observará un fragmento diferenciado del tamaño esperable en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio en todas las muestras, excepto en el lugar en el que se carga un testigo. Si se observa producto en el lugar del testigo, entonces una de las soluciones ha sufrido contaminación. En este caso, el experimento y todas las soluciones de trabajo deben descartarse y deben lavarse las micropipetas.

La ausencia de un fragmento en todos los carriles indica que la PCR ha sido fallida. Esto puede deberse a diversas razones; la más obvia es la escasa calidad o la omisión de alguno de los reactivos esenciales. La reacción puede también fracasar si la concentración de magnesio es demasiado baja o si la temperatura de hibridación es demasiado alta. La calidad del ADN es con frecuencia una de las principales razones de fracaso. Si una muestra de ADN concreta no consigue amplificarse de forma repetida, entonces debe extraerse una nueva muestra con fenol y cloroformo, y ser de nuevo precipitada en un décimo de volumen de acetato de amonio a una concentración de 5 mol/l y 2,5 volúmenes de etanol (v. protocolo de extracción de ADN, pág. 497). Otro problema es la presencia de fragmentos no específicos o sólo una banda de producto amplificado. Esto puede ocurrir si la concentración de magnesio es demasiado alta o la temperatura de hibridación demasiado baja.

ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Presencia o ausencia de un producto de la reacción en cadena de la polimerasa

Los productos de la PCR son más frecuentes y fácilmente visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa. Si en un experimento se utilizan cebadores y controles apropiados, la presencia real de un producto puede ser altamente informativa.

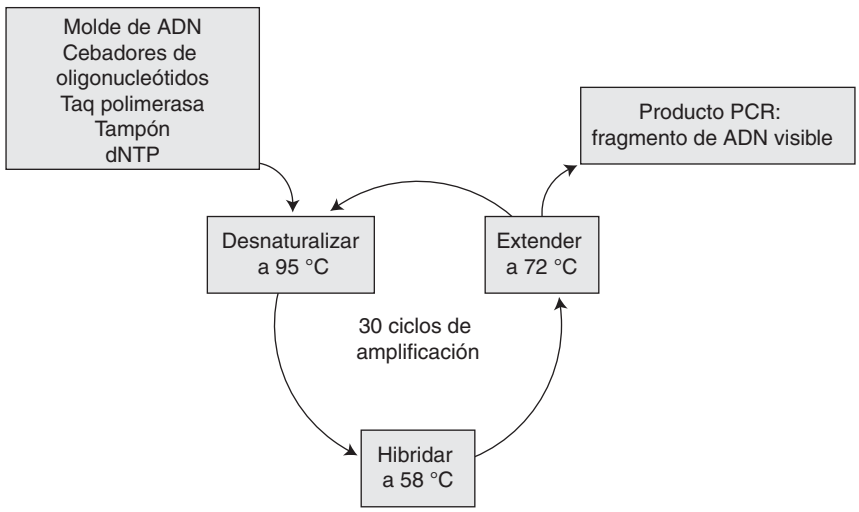


Figura 21.1. Reacción en cadena de la polimerasa. Repetición cíclica de tres temperaturas para desnaturalizar, hibridar y extender el ADN, respectivamente, dando lugar a una amplificación exponencial de un fragmento de ADN entre las dos secuencias de los cebadores dirigiendo la síntesis de ADN en cadenas opuestas del molde de ADN.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Sistema de mutación refractario a la amplificación

Principio

Las mutaciones puntiformes y las inserciones o deleciones pequeñas pueden identificarse directamente por la presencia o ausencia de un producto de PCR utilizando cebadores específicos de alelo[9,10]. Se utilizan dos oligos diferentes que difieren sólo en el sitio de la mutación (sistema de mutación refractario a la amplificación o SMRA, cebadores) distinguiendo el desequilibro de la base normal y mutante localizada en el extremo 3′ del oligo. En una PCR, un oligo con un desequilibrio en su extremo 3′ fallará en la iniciación del paso de extensión de la reacción. Cada muestra de prueba es amplificada en dos reacciones por separado que contienen un cebador SMRA mutante o un cebador SMRA normal. El cebador mutante iniciará la amplificación junto con un cebador de ADN que presente esta mutación pero no a partir de un ADN normal. Un cebador normal hará lo opuesto. Para aumentar la inestabilidad del desequilibrio en el extremo 3′ y así asegurar el fallo de la amplificación, a veces es necesario introducir un segundo nucleótido que produzca un desequilibrio a tres o cuatro bases del extremo 3′ de ambos oligos. Se incluye un segundo par de cebadores no relacionados a distancia de los cebadores del SMRA en cada reacción como un control interno a fin de demostrar que ha tenido lugar una amplificación eficiente. Esto es esencial porque un fallo del cebador SMRA para amplificar se interpreta como un resultado significativo y no debe ser el resultado de condiciones subóptimas para la reacción.

Interpretación

En todas las muestras, excluyendo el testigo, debe observarse el fragmento producido por amplificación con los cebadores de control interno. Si éste es el caso, entonces la presencia o ausencia de una mutación se determina simplemente por la presencia o ausencia del fragmento esperado producido por amplificación con el cebador de SMRA mutante y el cebador común. La presencia o ausencia del alelo normal es determinada de esta misma forma en la reacción que incluye el cebador SMRA normal. De esta forma pueden distinguirse los genes heterocigotos y homocigotos normales y los genes mutantes homocigotos. Un ejemplo de este análisis en el diagnóstico de la mutación de la talasemia β se ofrece en la página 482.

PCR-Gap

Deleciones extensas pueden detectarse mediante la PCR-Gap. Los cebadores localizados 5′ y 3′ con respecto a los puntos de corte de una deleción estarán demasiado lejos en el cromosoma normal para generar un fragmento en una PCR estándar. Cuando la deleción existe, estos cebadores se aproximarán, posibilitando la generación de un producto. Un ejemplo de este proceso se ofrece para la detección de deleciones en la α^o talasemia de la página 482.

Por el mismo principio, los cebadores pueden reunirse a través de la translocación cromosómica, dando lugar a un producto diagnóstico. Los puntos de corte pueden concentrarse a lo largo de una región demasiado extensa para que el ADN genómico sea utilizado en estos casos. Sin embargo, las translocaciones leucémicas pueden también dar lugar a genes de fusión transcritos. Los cebadores de genes diferentes son a continuación yuxtapuestos en una molécula de ARN mensajero híbrido (ARNm) y puede generarse un producto mediante PCR con transcripción inversa (PCR-TR). Un ejemplo de esto se ofrece en el análisis de la enfermedad mínima residual en la leucemia mieloide crónica (LMC) en la página 485.

Tamaño del producto de la PCR

Principio

Las deleciones e inserciones pueden identificarse con sencillez, después de la electroforesis en gel de agarosa, cuando su tamaño altera significativamente el del producto de la PCR. Se ofrece un ejemplo de este análisis para una mutación en una talasemia β en la página 482.

Después de la electroforesis en gel de poliacrilamida se consigue una resolución superior de los tamaños de los fragmentos. Esto es especialmente importante en el análisis de secuencias de repeticiones cortas en tándem (STR) que pueden ser altamente variables en longitud y, por tanto, útiles como marcadores genéticos de diferentes individuos. En la actualidad se alcanza una alta resolución para los fragmentos de ADN sobre geles de acrilamida o capilares con la utilización de analizadores *de ADN Advanced Appliedbiosystems (ABI) de 370 o 3700*. Estos aparatos leen fragmentos de ADN marcados con fluorescencia conforme salen del gel y posibilitan la resolución de una base única entre un grupo de 50-800 pb. Las reacciones PCR pueden transformarse fácilmente utilizando cebadores etiquetados con fluorescencia, de forma que dichos analizadores se utilizan con frecuencia en el genotipado de los STR y en la derivación de datos de secuencia de ADN. Un ejemplo del uso del genotipado STR en los estudios de quimerismo se ofrece en la página 494.

También se utiliza un gel de alta resolución en el análisis PCR de los reordenamientos genéticos de inmunoglobulinas y receptores de células T (RCT) para el diagnóstico de los trastornos linfoproliferativos descritos en la página 494. Una modificación de esta técnica, haciendo migrar los productos desnaturalizados de la PCR en un gel no desnaturalizante, posibilita la migración de fragmentos de cadena única para su ulterior determinación. En estos geles, la migración de los productos no depende sólo de su tamaño sino también de su secuencia porque fragmentos con diferentes secuencias se pliegan de formas diferentes y la estructura secundaria formada afecta a su movilidad. Ésta es la base de la técnica de polimorfismos de conformación de cadena única (SSCP), que se suele utilizar para localizar mutaciones puntuales y puede también utilizarse en estudios de reordenamiento.

Reactivos y métodos

Véase el apéndice C, página 501.

Digestión con enzimas de restricción

Principio

Las enzimas de restricción (ER) rompen el ADN en cortas secuencias específicas. Dado que se dispone de muchas ER, no es infrecuente que por coincidencia un único punto de mutación cree o destruya una secuencia de reconocimiento del ER. Si éste es el caso, la digestión del producto oportuno de la PCR previamente a la electroforesis en gel de agarosa aumenta las posibilidades de identificar la mutación. Puede predecirse una diferencia en el tamaño de los fragmentos de restricción vista en muestras normales y mutantes a partir de un mapa de restricción del fragmento implicado y el lugar de la mutación que cambia un sitio de restricción. Los fragmentos observados deben ser coherentes con el patrón normal o con el patrón mutante. En la página 482 se muestra un ejemplo en el diagnóstico de la mutación en las células falciformes.

Incluso cuando una mutación no crea ni destruye por sí misma un sitio de un ER, este método puede aplicarse si una de las secuencias del cebador se modifica. En esta técnica, que ha sido denominada sitio de amplificación creado por enzimas de restricción (del inglés, *amplification created restriction enzyme site*) (ACRES), uno o dos desapareamientos deliberados son introducidos en un cebador, a una distancia de 2 a 5 bases de su extremo 3′, que se localiza a continuación inmediatamente adyacente al sitio de la mutación. Estos desapareamientos serán incorporados a un producto de la PCR y pueden ser designados como un sitio de ER que es creado en presencia bien de la base normal o de la base mutante en el sitio apropiado. La disociación con esta enzima distinguirá las secuencias mutantes de las normales. Un ejemplo de este análisis es presentado para las mutaciones de las regiones no traducidas 3′(UTR) del factor V de Leiden (FVL) y de la protrombina en la página 484.

Método

Véase el apéndice D, en la página 502.

Hibridación con oligonucleótidos específicos de alelo

Principio

Bajo condiciones adecuadas, sondas cortas de oligonucleótidos se hibridarán con su secuencia complementaria exacta pero no en una secuencia donde existe un único desapareamiento de una base[11]. Por tanto, se utiliza un par de oligos para evaluar la presencia de una mutación puntual: un oligo complementario mutante para la secuencia mutante y un oligo normal complementario para la secuencia normal, con la diferencia de secuencia ubicada cerca del centro de cada oligo.

La estabilidad del dúplice formado entre el oligo y el ADN diana que está siendo analizado (el producto de la reacción de PCR) depende de la temperatura, de la composición de bases y de la longitud del oligo, así como de la fuerza iónica de la solución de lavado. Para los estudios de hibridación con oligonucleótidos aleloespecíficos (ASOH), se ha desarrollado una fórmula empírica para determinar la temperatura de disolución (TD), que es la temperatura a la que la mitad de los dúplices se disocian. Este valor se utiliza como una guía; la temperatura exacta a la que se mantiene tan sólo el emparejamiento perfecto de bases se determina habitualmente por un método de ensayo y error. El método se describe en manuales especializados de laboratorio[4].

Interpretación

Los oligos deben hibridar con su secuencia de ADN exacta, de forma que el oligo mutante genere una señal con un control mutante homocigoto pero no con un control normal. Cuando éste es el caso, la interpretación del resultado es directa; una señal positiva de un oligo determinado indica la presencia de ese alelo en la muestra de la prueba. Los heterocigotos y homocigotos se distinguen utilizando los oligos mutante y normal en tándem. Si no hay diferencia significativa en la intensidad de la señal radioactiva en las muestras control, puede ser necesario un posterior lavado de los filtros a una temperatura superior (p. ej., Td + 2 °C). Un problema con este método es que requiere tiempo y se debe prestar atención para establecer la situación de lavado correcta para cada oligo, En la actualidad, en este procedimiento[12] se usan sondas no radioactivas, con sistemas de detección en los que interviene la peroxidasa de rábano picante. Esta técnica ha sido modificada de forma que los oligonucleótidos aleloespecíficos son inmovilizados en la membrana de nailon y el producto de PCR específico del paciente es utilizado como sonda: el procedimiento de hibridación en gota inversa[13]. Este método permite que varias mutaciones diferentes sean analizadas de forma simultánea y ha demostrado ser especialmente útil en el diagnóstico de las mutaciones de la talasemia β[14].

INVESTIGACIÓN DE LAS HEMOGLOBINOPATÍAS

Enfermedad de células falciformes

La presencia de un gen en las células falciformes puede determinarse mediante electroforesis de la hemoglobina en acetato de celulosa o prueba de falciformación. Sin embargo, hay ocasiones en que es beneficioso hacer este diagnóstico mediante un análisis de ADN (p. ej., en el diagnóstico prenatal, que puede ser realizado a las 10 semanas de gestación, en la distinción entre la talasemia HbS/S de la HbS/β, o en la confirmación del diagnóstico de anemia por células falciformes en un neonato). Para el tipo de especímenes recogidos a fin de realizar un diagnóstico prenatal, véase la página 267.

La mutación de células falciformes en el codón 6 del gen de la globina β (GAG → GTG) tiene como resultado la pérdida de un sitio de restricción Bsu36 I (o Mst II, Sau I, OxaN I o Dde I) que se encuentra en el gen normal. Por consiguiente, es posible detectar la mutación directamente

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

mediante el análisis de un fragmento de ADN generado por PCR con enzimas de restricción. Se utiliza un par de cebadores para amplificar los exones 1 y 2 del gen de la globina β, y los productos de la PCR son digeridos con Bsu36 I. La pérdida de un sitio Bsu36 I en el gen de las células falciformes da lugar un fragmento de restricción anormalmente largo que no es observado en los individuos normales (fig. 21.2).

Talasemia β

Los grupos étnicos con la mayor incidencia de talasemia β son las poblaciones mediterráneas, indios asiáticos, chinos y africanos. Aunque se conocen más de 100 mutaciones para la talasemia β, cada uno de estos grupos tiene un subconjunto de mutaciones, de forma que 5 mutaciones diferentes pueden ser las implicadas en más del 90% de los individuos afectados en una determinada población. Esto hace de la detección directa de mutaciones de talasemia β una posibilidad razonable y se ha convertido en el método de elección en el supuesto más importante, es decir, en el diagnóstico prenatal[14,15].

La mayoría de mutaciones causales de talasemia β son mutaciones puntuales que afectan a la secuencia codificadora, a los sitios de corte o al promotor del gen de la β globina. Los métodos preferibles para su detección son bien el SMRA bien el análisis de hibridación en gota inversa. Las deleciones más extensas pueden establecerse directamente a partir del tamaño del producto amplificado. Si la mutación es desconocida, puede identificarse mediante un análisis de secuencia.

Ejemplo 1. Deleción de 619 pb

Utilizando cebadores que flanquean esta frecuente mutación por deleción, el tamaño del producto de la PCR es directamente informativo (fig. 21.3). Cuando existe la deleción, se observa un pequeño fragmento de 224 pb, comparado con el fragmento de 843 pb derivado del cromosoma normal. Este par de cebadores pueden también utilizarse como controles internos de la PCR cuando se utilizan los cebadores de SMRA.

Ejemplo 2. Mutación por corrimiento de lectura 41/42

En este diagnóstico, la presencia o ausencia del producto generado por los oligos SMRA y el cebador común determina el genotipo de la prueba individual. Un ejemplo de esto se muestra en la figura 21.4. Todos los individuos han amplificado con los cebadores control *(banda superior)* y el cebador normal (*banda inferior*, *carriles 6-9*). Dos también han amplificado con el cebador mutante *(carriles 3 y 4)*; estos dos individuos son, por consiguiente, heterocigotos para la mutación por corrimiento de lectura 41/42.

Talasemia α

A diferencia de las talasemias β, los cambios más frecuentes en las talasemias α son deleciones. Existen dos categorías: aquellas que eliminan sólo uno de los dos genes de α globina en cualquiera de los dos cromosomas (α^+ talasemia) y aquellas que eliminan ambos genes α de un cromosoma (α^0 talasemia). Aunque la amplificación con PCR alrededor del lugar de la α globulina ha demostrado ser bastante difícil, las deleciones frecuentes pueden identificarse actualmente por una técnica de PCR-Gap razonablemente fiable[16]. En estas reacciones se añaden dimetilsulfóxido (DMSO) y betaína (v. apéndice B, pág. 499). Se exponen dos reacciones de PCR multiplex diferentes, una para las talasemias comunes α^+ (α-$^{3.7}$ y α-$^{4.2}$) y una para las talasemias comunes α^0 (--SEA, --MED, --FIL y α-$^{20.5}$). El fragmento generado por estos cebadores a través del punto de corte de la deleción es diferente en tamaño al fragmento generado a partir del cromosoma normal. Los cebadores que flanquean el punto de corte de la deleción están demasiado lejanos para generar un fragmento del cromosoma normal en la PCR. Sólo cuando éstos se aproximan como resultado de la deleción puede producirse un fragmento. Las secuencias de cebadores utilizadas en este análisis se exponen en la tabla 21.1, y un ejemplo de su

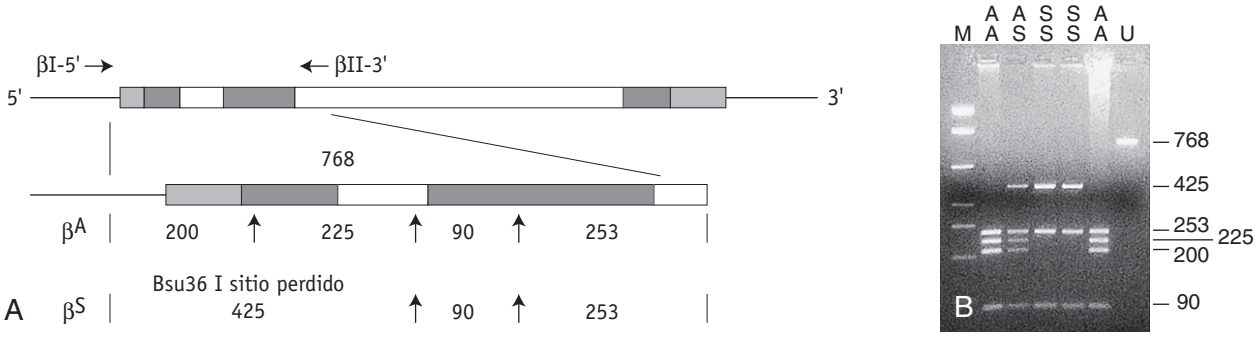


Figura 21.2 **Detección de la mutación de células falciformes.** A: Un esbozo del gen de la β globina muestra la posición de los cebadores utilizados para amplificar un fragmento de 768 pb en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La secuencia de β I–5′ es 5′TAAGCCAGTGCCAGAAAGAGCC3′ y la de β II-3′ es 5′CATTCGTCTGTTTCCCATTCTA3′. Más abajo se muestran mapas de los sitios de restricción de Bsu36 I y los tamaños de los fragmentos de los genes βA y βS. B: Un minigel teñido con bromuro de etidio ilustra los tamaños de los fragmentos generados por la digestión con Bsu36 I del producto PCR de individuos normales (A/A), con rasgo falciforme (A/S) y anemia de células falciformes (S/S), junto con el fragmento no digerido amplificado (U) y el marcador de tamaño molecular (M).

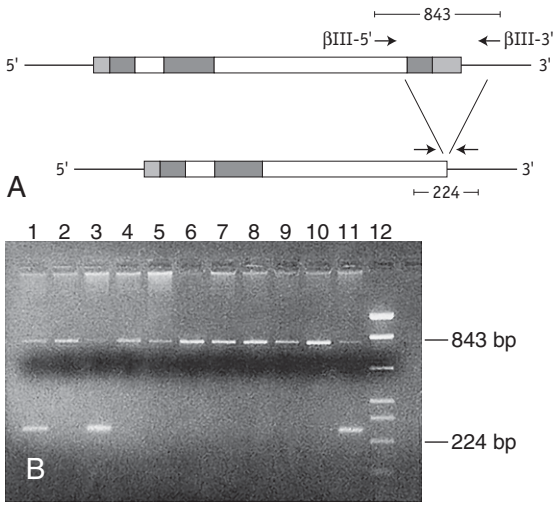


Figura 21.3. Detección de una deleción de 619 pb utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). A: Un esbozo del gen de la β globina y del gen delecionado muestra la localización de los cebadores *(flechas)* utilizados para amplificar a lo largo de esta deleción. La secuencia de β III-5′ es 5′ACAGTGATAATTTCTGGGTT3′ y la de β III-3′ es 5′TAAGCAAGAGAACTGAGTGG3′. B: Un minigel muestra el fragmento esperado de 843 pb generado por los dos cebadores de un gen de β globina normal en todos los carriles y el fragmento de 224 pb derivado de un gen delecionado en individuos que son heterocigotos para la mutación en los carriles 1, 3 y 11.

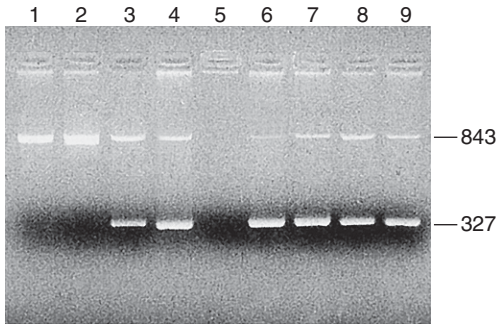


Figura 21.4. Diagnóstico de la mutación estructural 41/42 (-TTCT) utilizando un sistema de mutación refractario a la amplificación (SMRA). El gel muestra el fragmento de 843 pb generado por los cebadores de control interno (β III-5′ y β III-3′) en todos los carriles, excepto en el carril 5, que es el testigo. Cuatro muestras de ADN son analizadas con el cebador SMRA mutante (5′GTCTACCCTTGGACCCAGAGGTTGA3′) en combinación con el cebador común (5′CATTCGTCTGTTTCCCATTCTA3′) en los carriles 1–4 y con el cebador SMRA normal (5′GTCTACCCTTGGACCCAGAGGTTCTT3′) en combinación con el cebador común en los carriles 6–9. La presencia de un producto de 327 pb en los carriles 3 y 4 y 6–9 indica que los individuos en los carriles 3 y 4 son heterocigotos para la mutación 41/42, mientras que los individuos 1 y 2 son normales con respecto a esta mutación.

aplicación en la detección de las talasemias α^0 se muestra en la figura 21.5. Se han descrito más de 30 formas no delecionales de talasemia α. De éstas, la mutación Hb Constant Spring y la $\alpha^{HphI}\alpha$ son relativamente frecuentes en el sureste asiático y en las poblaciones mediterráneas, respectivamente. Pueden ser detectadas mediante ASOH, SMRA, digestión con enzimas de restricción o secuenciación directa del producto PCR apropiado. A diferencia de las talasemias β, las talasemias α no son fácilmente diagnosticadas utilizando técnicas hematológicas de rutina. El diagnóstico de talasemia α se suele hacer tras excluir las talasemias β y la ferropenia. Debido a que la gran mayoría de casos de talasemia α son clínicamente benignos (esto es, α^+ talasemias), es debatible si el análisis molecular está justificado para realizar un diagnóstico en estos individuos. Sin embargo, es importante que los individuos con α^0 talasemias sean identificados, y el único diagnóstico definitivo es el análisis de ADN. Las talasemias α^0 están casi limitadas por entero a grupos étnicos de riesgo, a saber, aquellos del sureste asiático y los de origen mediterráneo, y así es más eficiente dirigirse a estos grupos de forma específica. El diagnóstico de α^0 talasemia es especialmente relevante si se plantea ofrecer un diagnóstico prenatal a una pareja que presenta riesgo de tener un feto con hidrops, donde existe un incremento del riesgo de muerte materna en el parto. Se han propuesto unas guías derivadas de la experiencia en el Reino Unido acerca de cómo y cuándo debe realizarse un análisis de ADN[17], pero continúan en revisión.

TRASTORNOS DE LA COAGULACIÓN

Trombofilia

Se han realizado considerables avances en nuestra comprensión de los factores de riesgo genéticos hallados en pacientes con tromboembolismos venosos (TEV)[18]. Entre éstos se encuentran las diversas mutaciones que causan deficiencias en proteína C, proteína S y antitrombina. Un aumento de concentración de factor VIII también es un factor de riesgo para los TEV, pero sus determinantes genéticos siguen siendo inciertos. Se ha comunicado que el estado homocigoto para la mutación común C677T del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa, que da lugar a una variante termolábil de esta proteína, sería un factor de riesgo para el TEV, aunque otros estudios no han apoyado esta afirmación. Una mutación puntual en el 3′ UTR del gen de la protrombina asociada a niveles elevados de proteína se ha identificado como un factor de riesgo genético para TEV[19]. El más frecuente de los factores de riesgo genéticos conocidos para el TEV es la resistencia al efecto anticoagulante de la proteína C activada causada por la sustitución de la Arg506Gln en el factor V (FVL)[20]; cerca de un 20% de los sujetos originarios de Europa del Norte que presentan un primer episodio de tromboembolismo son heterocigotos para esta mutación. Debido a su prevalencia, y ya que las pruebas se han convertido en relativamente sencillas, existe una tendencia al examen indiscriminado de estos factores de riesgo en la trombofilia, pero sin un ase-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 21.1. Cebadores utilizados en el análisis de la α-talasemia mediante Gap-PCR

Nombre del cebador	Secuencia, 5′→3′	Concentración (μmol/l)
α°	PCR Multiplex	PCR Multiplex
20.5(F)	GGGCAAGCTGGTGGTGTTACACAGCAACTC	0.1
20.5(R)	CCACGCCCATGCCTGGCACGTTTGCTGAGG	0.1
α/SEA(F)	CTCTGTGTTCTCAGTATTGGAGGGAAGGAG	0.3
α(R)	TGAAGAGCCTGCAGGACCAGGTCAGTGACCG	0.15
MED(F)	CGATGAGAACATAGTGAGCAGAATTGCAGG	0.15
MED(R)	ACGCCGACGTTGCTGCCCAGCTTCTTCCAC	0.15
SEA(R)	ATATATGGGTCTGGAAGTGTATCCCTCCCA	0.15
FIL(F)	AAGAGAATAAACCACCCAATTTTTAAATGGGCA	1.6
FIL(R)	GAGATAATAACCTTTATCTGCCACATGTAGCAA	1.6
α+	PCR Multiplex	De J Old, comunicación personal
3.7F	CCCCTCGCCAAGTCCACCC	0.4
3.7/20.5R	AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG	0.4
4.2F	GGTTTACCCATGTGGTGCCTC	0.6
4.2R	CCCGTTGGATCTTCTCATTTCCC	0.8
α2R	AGACCAGGAAGGGCCGGTG	0.1

PCR, reacción en cadena de la polimerasa.

soramiento cuidadoso e informado dicha práctica puede ser muchas veces inadecuada[21]. (V. también cap. 17.)

Método

Se han utilizado muchos métodos distintos para detectar estas mutaciones. El método descrito aquí es un multiplex que detecta de forma simultánea las mutaciones de la protrombina y del factor V. Hemos adaptado secuencias de cebador para crear sitios Taq I en ambos genes (un ejemplo de la técnica ACRES), que se pierden cuando existe una mutación.

La PCR se realiza como se describe en el apéndice B, utilizando tampón III con una concentración de $MgCl_2$ de 2,0 mmol/l. El cebador directo en el gen del factor V es 5′GTAAGAGCAGATCCCTGGACAGtC3′, con el error de apareamiento deliberado que se muestra en el caso inferior. El cebador inverso es 5′TGTTATCACACTGGTGCTAA3′. La secuencia normal del gen en la posición de la mutación es AGGCGA, alterada a AGGCAA en el FVL. Las últimas 4 bases del oligo mutagénico (AGtC) crearán un sitio Taq I (TCGA) en el gen normal (AGtCGA), que no estará presente en el gen del FVL (AGtCAA). Un principio similar se aplicar al gen de la protrombina para el que los cebadores directo e inverso son 5′CAATAAAAGTGACTCTCAtC3′ y 5′AGGTGGTGGATTCTTAAGTC3′, respectivamente. Los productos de la PCR se digieren con Taq I a 65 °C como se describe en la página 502.

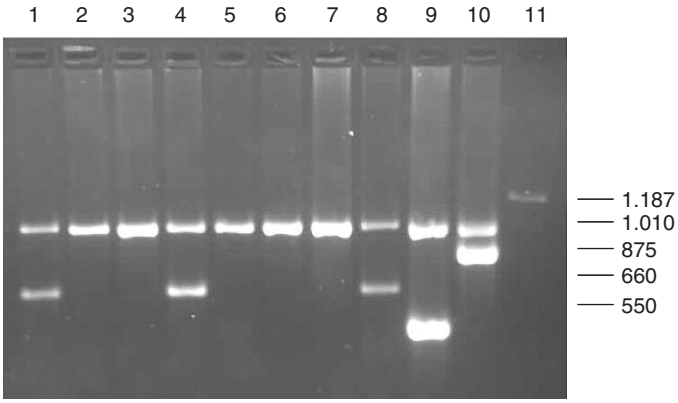


Figura 21.5. Detección de α^0 talasemia por Gap-PCR multiplex. Las secuencias de los cebadores utilizados se muestran en la tabla 21.1. Un fragmento normal de 1.010 pb es generado por los cebadores α/SEA(F) y α/(R)en todos los carriles (aunque es muy tenue en el carril 11). Además, un fragmento de 660 pb es generado por el par cebador α/SEA(F) y SEA(R) en los carriles 1, 4 y 8 en individuos que son heterocigotos para la deleción – –SEA; un fragmento de 550 pb es generado por el par cebador FIL(F) y FIL(R) en el carril 9 en un individuo que es heterocigoto para la deleción – –FIL; un fragmento de 875 pb es generado por el par cebador MED(F) y MED(R) en el carril 10 en un individuo que es heterocigoto para la deleción – –MED; y un fragmento de 1.187 pb es generado por el par cebador 20.5(F) y 20.5(R) en el carril 10 en un individuo que es heterocigoto para la deleción $-\alpha^{20.5}$.

Interpretación

El par cebador del factor V da lugar a un fragmento de 181 pb; después de una disociación con Taq I, el gen normal (1691G) genera fragmentos de 157 y 24 pb, mientras que el gen mutante (1691A) queda sin cortar a 181 pb. Aunque el fragmento de 24 pb no se detecta con facilidad, los fragmentos de 157 pb y 181 pb se determinan claramente en un gel de agarosa al 3% (fig. 21.6). Cuando sólo se observa el fragmento más pequeño, la muestra es normal (1691 G/G); cuando se observan tanto el fragmento más pequeño como el más grande, la muestra es heterocigota para el FVL (1691 A/G); cuando sólo el fragmento más largo es determinado, la muestra es homocigota para FVL (1691 A/A). El mismo principio se aplica al fragmento de la protrombina, siendo el gen normal (20210G) cortado por la Taq I a 98 pb mientras que el gen mutante (20210 A) no se corta a 118 pb (v. fig. 21.6). La enzima de la Taq I es relativamente fiable y estable, y la digestión parcial (el único escollo potencial en este análisis) se evita utilizando un exceso significativo de enzima. La presencia tanto de fragmentos de factor V como de protrombina en los mismos tubos controla la eficacia de la enzima de restricción debido a que uno de éstos es habitualmente normal y, por tanto, muestra una digestión completa. El análisis sólo requiere confirmación cuando un individuo parece tener mutaciones tanto en la protrombina como en el factor V.

Trastornos de la coagulación

Diversas mutaciones subyacen a la hemofilia A y hemofilia B, y éstas son habitualmente identificadas mediante exones de detección para mutaciones mediante SSCP, cromatografía líquida desnaturalizante de alto rendimiento o análisis directo de secuencia de ADN en laboratorios especializados[22]. Puede todavía ser relevante para determinar el estado de portador y ofrecer diagnóstico prenatal a través de análisis genético. Los problemas derivan del número de casos esporádicos, la falta de marcadores informativos, familiares no disponibles y la posibilidad de recombinación.

De particular significación diagnóstica es el hecho de que entre un tercio y la mitad de todos los pacientes con hemofilia A grave tienen una mutación por inversión genómica extensa que afecta la recombinación entre una región en el intrón 22 del gen del factor VIII y las secuencias homólogas teloméricas[23]. Estas inversiones son rápidamente detectadas mediante análisis con el método de Southern utilizando la sonda p482.6 para digeridos de ADN[24] genómico por Bcl I. Un método también recientemente descrito utilizando PCR de larga distancia posibilita la identificación de estas mutaciones por deleción en una reacción en tubo único[25].

(V. cap. 16 para más información sobre trastornos hemorrágicos.)

LEUCEMIA Y LINFOMA

Principios citogenéticos y terminología

El análisis citogenético es habitualmente llevado a cabo por citogenetistas especialmente entrenados en un laboratorio independiente que no suelen tener relación específica con el laboratorio de hematología. Por esta razón no se ofrecen detalles de las técnicas. Sin embargo, el análisis citogenético es tan crucial para el diagnóstico y manejo de las neoplasias hematológicas que es necesario para los hematólogos comprender los principios y ser capaces de interpretar los informes que reciben. Además, los hematólogos están normalmente implicados en la extracción de muestras adecuadas. Los análisis citogenéticos clásicos se hacen en células que han entrado en mitosis y han sido detenidas en metafase de forma que los cromosomas individuales pueden ser reconocidos por su tamaño y por su patrón de bandas después de la tinción (p. ej., tinción de Giemsa [bandeo G] o tinción con fluorescencia). Las bandas oscuras y claras alternantes son numeradas desde el centrómero hacia el telómero para facilitar la descripción de cualquier anomalía detectada. Un ejemplo que muestra la translocación equilibrada t(9;22) (q34;q11) en la LMC se presenta en la figura 21.7. La terminología estándar aplicada a cromosomas se muestra en la tabla 21.2.

Los resultados del análisis citogenético pueden exponerse de forma visual (un cariograma) o por escrito de acuerdo con convenciones estándar (un cariotipo). Por tanto, un 46,XY, t(3;3)(q21;q26) [20] indica un cariotipo seudodiploide en un varón; ha tenido lugar una translocación recíproca entre los cromosomas 3 pareados después de que tuviese lugar una ruptura en 3q21 en un cromosoma (esto es, implicando el brazo largo del cromosoma 3, banda 2, subbanda 1) y en el 3q26 en el otro. La 46,XY,inv(3)(q21q26) indica un cariotipo seudodiploide con una inversión paracéntrica del brazo largo de un cromosoma 3 único; los puntos de corte son los mismos en primera instancia pero son sobre un cromosoma único. Obsérvese la utilización de

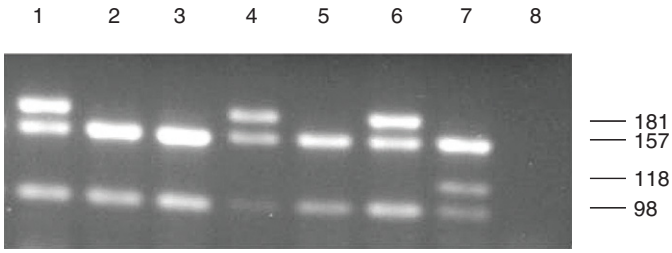


Figura 21.6. Detección de mutaciones del factor V de Leiden (FVL) y de la protrombina 3′UTR utilizando sitios de enzima de restricción creados por amplificación (ACRES). Los productos de reacción en cadena de la polimerasa son digeridos con Taq I previamente a la electroforesis en gel de agarosa, como se describe en el texto. Los heterocigotos para la mutación en el FVL se identifican en los carriles 1, 4 (donde el fragmento de protrombina es débil) y 6, mientras que un heterocigoto para la mutación de la protrombina se identifica en el carril 7. Los otros sujetos son normales. El carril 8 es el control.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

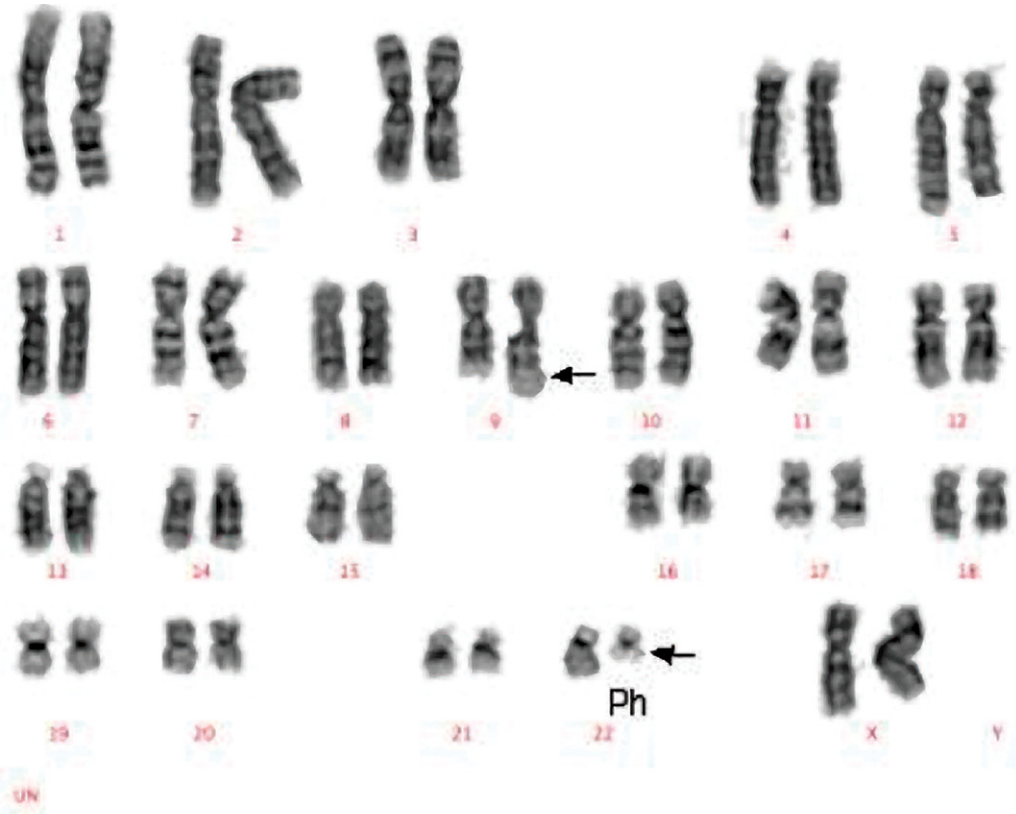


Figura 21.7. Cariotipo por Bandas-G. Cariotipo femenino con una translocación recíproca equilibrada entre los cromosomas 9 y 22 *(señalados con flechas)* que da lugar al cromosoma Philadelphia (Ph). Cortesía de J. Howard.

punto y coma al describir una translocación, mientras que no los hay cuando se trata de una inversión. Los números mostrados dentro de los paréntesis cuadrados en un cariotipo indican el número de células que presentan el hallazgo especificado normal o anormal. Los análisis citogenéticos pueden hacerse en las siguientes células:

1. Fibroblastos de piel o linfocitos estimulados con fitohemaglutinina (PHA) (para estudiar anomalías constitucionales).
2. Células de médula ósea.
3. Células sanguíneas.
4. Células aisladas de ganglios linfáticos u otros órganos que se sospecha que pueden haber sido infiltrados por una neoplasia linfoide u otra neoplasia.
5. Células aisladas de efusiones séricas.

En el estudio de sospecha de neoplasias hematológicas, hay dos razones para intentar detectar alteraciones constitucionales. Primero, puede existir una alteración constitucional que subyace a una neoplasia hematológica como cuando aparece una leucemia megacarioblástica en el síndrome de Down. Segundo, puede existir una alteración cromosómica constitucional irrelevante y previamente no detectada que debe ser identificada para que pueda distinguirse de una alteración cromosómica adquirida asociada con un proceso neoplásico.

Las indicaciones para el análisis citogenético en una neoplasia definida o sospechada son las siguientes:

1. Proporcionar evidencia de clonalidad y permitir un diagnóstico de una enfermedad neoplásica cuando no ha sido demostrado de otra forma (p. ej., en algunos pacientes con eosinofilia o un incremento de linfocitos NK).
2. Para confirmar un diagnóstico específico (p. ej., leucemia aguda promielocítica, linfoma de Burkitt, etc.).
3. Para permitir la clasificación (p. ej., aplicar la clasificación de la Organización Mundial de la Salud de leucemia aguda mieloide y de los síndromes mielodisplásicos).
4. Para dar información pronóstica (p. ej., la detección de hiperdiploidia [de buen pronóstico] en la leucemia linfoblástica aguda [LLA]).
5. Para indicar qué genes de fusión es probable que estén presentes y, por tanto, pueden proporcionar información permitiendo la detección de enfermedad mínima residual mediante análisis molecular.
6. Para distinguir un cambio fenotípico que tiene lugar en un único clon de una leucemia secundaria relacionada con el tratamiento.
7. Para distinguir la leucemia aguda secundaria al tratamiento tras el uso de agentes alquilantes de aquellas secundarias a fármacos que interactúan con la topoisomerasa II.

Tabla 21.2. Terminología y abreviaturas utilizadas en el análisis citogenético clásico

Término	Abreviatura	Explicación
Centrómero	Cen	Unión de los brazos corto y largo de un cromosoma
Telómero	Tel	Terminación de los brazos corto y largo de un cromosoma, ptel o qtel
Brazo largo	Q	El más largo de los dos brazos del cromosoma que se unen en el centrómero
Brazo corto	P	El más corto de los dos brazos del cromosoma que se unen en el centrómero
Diploide		Presencia de la dotación total de 46 cromosomas: 44 autosomas pareados y dos cromosomas sexuales en una célula o clon
Haploide		Presencia de 23 cromosomas: una única copia de cada autosoma y bien un cromosoma X o Y en una célula o clon
Tetraploide		Presencia de un total de 92 cromosomas: cuatro copias de cada autosoma y cuatro cromosomas sexuales en una célula o clon
Aneuploide		Presencia de un número de cromosomas que no es ni diploide ni un múltiplo de un número diploide, en una célula o clon
Seudodiploide		Presencia de 46 cromosomas en una célula o clon pero con alteraciones estructurales o con pérdida o ganancia de material génico en diferentes cromosomas de forma que no todos los cromosomas están emparejados
Hiperdiploide		Presencia de más de 46 cromosomas en una célula o clon
Hipodiploide		Presencia de menos de 46 cromosomas en una célula o clon
Monosomía	– (un signo menos antes del número de cromosoma, p. ej., –7)	Pérdida de un cromosoma de uno de los pares
Trisomía	+ (un signo más antes del número de cromosoma p. ej., +13)	Ganancia de un cromosoma de forma que existen tres en vez de dos copias
Deleción	«del» o un signo menos después del número y designación del brazo de un cromosoma: p. ej., del(20q) or 20q–	Pérdida de una parte del brazo corto o largo de un cromosoma
Translocación	T	Movimiento de un segmento o segmentos cromosómicos entre dos o más cromosomas; una translocación puede ser recíproca o no recíproca
Translocación recíproca		Intercambio de segmentos entre dos o más cromosomas
Translocación no recíproca		Movimiento de un segmento de un cromosoma a otro pero sin reciprocidad
Translocación equilibrada		Translocación que tiene lugar sin pérdida de material cromosómico, o al menos sin pérdida de suficiente material para que sea detectable mediante el examen microscópico de los cromosomas
Translocación no equilibrada		Translocación que se asocia con ganancia o pérdida de un cromosoma
Inversión	inv	Inversión de una parte de un cromosoma, bien pericéntrica bien paracéntrica
Inversión pericéntrica		Inversión que se produce por la ruptura de tanto el brazo largo como el corto, de forma que la parte del cromosoma que se invierte incluye el centrómero
Inversión paracéntrica		Inversión que se produce como consecuencia de dos rupturas, bien en el brazo corto bien en el largo, de un cromosoma de forma que la parte del cromosoma que se invierte no incluye el centrómero

(Continúa)

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 21.2, Terminología y abreviaturas utilizadas en el análisis citogenético clásico *(cont.)*

Término	Abreviatura	Explicación
Inserción	ins	Inserción de un segmento de un cromosoma en otro cromosoma o en una posición diferente en los mismos cromosomas. Puede ser directa o invertida
Isocromosoma	i	Un cromosoma con dos brazos largos o cortos unidos en centrómero; p. ej., i(17q)
Derivativo	der	Un cromosoma derivado de otro; un cromosoma derivativo derivado de dos o más cromosomas lleva el número de los cromosomas que aportó el centrómero
Duplicación	dup	Duplicación de una parte de un cromosoma
Clon		Población de células derivadas de una célula única; en el análisis citogenético se considera la existencia de un clon si dos células comparten la misma alteración estructural o un cromosoma adicional o si tres células han perdido el mismo cromosoma
Marcador	mar	Un cromosoma anormal de origen incierto que «marca» un clon
Constitucional	c	Alteración cromosómica que es parte de la constitución de un individuo en vez de ser adquirido; p. ej. 21c in el síndrome de Down

Para la investigación de neoplasias hematológicas, el tejido preferible suele ser un aspirado de médula ósea. También es posible desagregar células de médula ósea a partir de un espécimen obtenido por biopsia y en un cultivo tisular. La sangre periférica puede presentar metafases cuando tiene muchas células inmaduras, pero es generalmente menos fiable que la médula ósea en lo que respecta a la aparición de células en división. En teoría, cualquier tejido infiltrado puede proporcionar células que pueden desagregarse y analizarse. En la práctica hematológica fundamentalmente se estudian células de los ganglios linfáticos, pero a veces se obtiene información clínicamente relevante de otros tejidos infiltrados. Un aspirado de médula ósea para análisis citogenético debería anticoagularse mediante la adición de heparina libre de conservantes o de un medio de cultivo tisular que contenga heparina. Puede almacenarse a temperatura ambiente durante algunas horas o a 4 °C si se espera un retraso en el análisis. Si va a ser enviada a un laboratorio central, se debe acompañar la muestra de información clínica y hematológica detallada de forma que el laboratorio central sea consciente de si hay urgencia clínica para obtener los resultados a fin de que se utilicen técnicas adecuadas.

Hibridación por fluorescencia *in situ*

La hibridación por fluorescencia *in situ* (FISH) une el análisis citogenético clásico y las técnicas de diagnóstico molecular. Los cromosomas pueden ser teñidos y visualizados pero la técnica también depende del reconocimiento de secuencias específicas de ADN por medio de una sonda fluorescente que puede ligarse a una secuencia de ADN específica. La FISH puede llevarse a cabo en preparaciones en metafase o en células en interfase. Las sondas de FISH pueden identificar:

Centrómeros de un cromosoma específico (útil para detectar una trisomía o una monosomía y quimerismo a continuación de un trasplante de médula ósea entre sexos diferentes; fig. 21.8A).

Oncogenes específicos (sonda específica de locus, útil para detectar translocaciones; fig. 21.8B y C).

Genes supresores tumorales específicos (sonda específica de locus; su pérdida es relevante para la progresión tumoral).

Otros genes útiles para el diagnóstico (sonda específica de locus, p. ej., para el gen *CHIC2*, que se pierde cuando una deleción intersticial conduce a la formación de un gen de fusión *FIP1L1-PDGFRA*).

Cromosomas completos (pintado total de cromosomas; útil en la identificación de reordenamientos cromosómicos complejos).

Entre las ventajas de los análisis por FISH en comparación con el análisis convencional de cromosomas se incluyen las siguientes:

1. Pueden ser examinadas muchas más células (útil para detectar enfermedad residual).
2. Las metafases no son esenciales, así que las alteraciones pueden detectarse en células que no están dividiéndose (útil en la leucemia linfocítica crónica).
3. La FISH puede realizarse en un período de tiempo más corto (puede ser crítico para confirmar un diagnóstico de leucemia promielocítica aguda).
4. Pueden detectarse anomalías que no pueden ser detectadas mediante análisis citogénetico convencional (p. ej., SIL-TAL fusión en LLA de linaje T o t(12;21) (p12;q22) en LLA de linaje B).

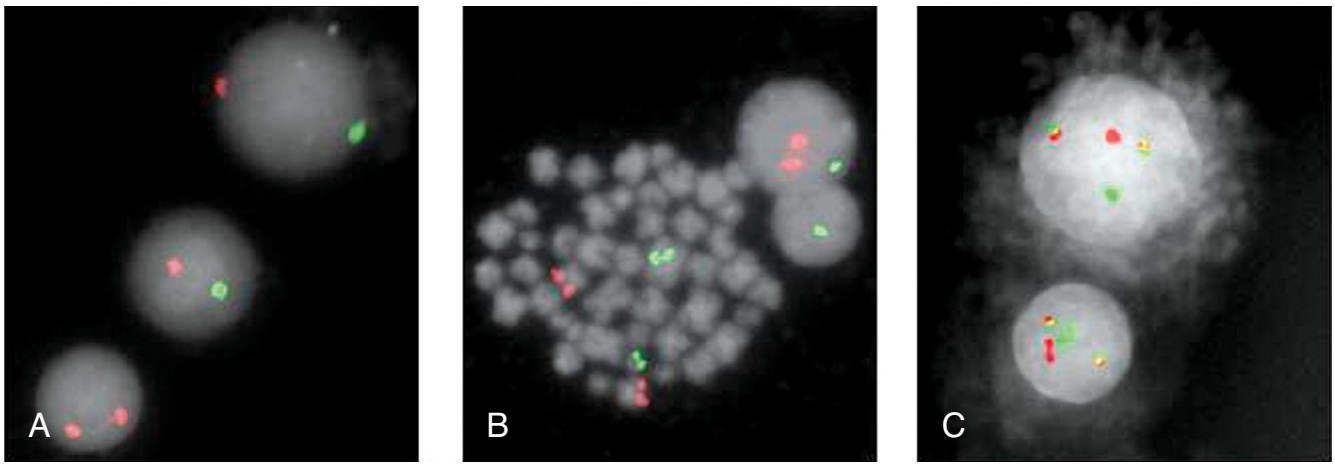


Figura 21.8. Hibridación por fluorescencia *in situ* (FISH). A: Utilización de una sonda dual X/Y (Abbott Diagnostics, Vysis) en un paciente con un trasplante de médula ósea procedente de donante del otro sexo. Dos interfases muestran una señal roja (cromosoma X) y una señal verde (cromosoma Y) que indican las células masculinas, mientras que una interfase muestra dos señales rojas (cromosomas X) lo que indica una célula femenina. B: Utilización de una sonda de translocación de fusión dual, color dual *BCR/ABL* (Abbott Diagnostics, Vysis). Una célula en metafase y una en interfase muestran dos señales rojas (del locus del gen *ABL* en el cromosoma 9) y dos señales verdes (del locus del gen *BCR* en el cromosoma 22). Estas células son por tanto negativas para la fusión de genes *BCR–ABL* a nivel citogenético molecular. C: Utilización de una sonda de translocación de fusión dual, color dual *BCR/ABL* (Abbott Diagnostics, Vysis). Las células en interfase muestran dos señales de fusión roja/verde (de la fusión *BCR–ABL* en el cromosoma 22 y de la fusión *ABL-BCR* en el cromosoma 9), una señal roja (locus del gen *ABL* en el cromosoma 9) y una señal verde (locus del gen *BCR* en el cromosoma 22). Esta muestra es por tanto positiva para el gen de fusión *BCR–ABL* a un nivel citogenético molecular. (Cortesía de J. Howard.)

La principal desventaja es que sólo se encontrarán aquellas anomalías que se buscan específicamente, mientras que el análisis citogenético convencional permite evaluar todos los cromosomas.

Translocaciones, análisis molecular y enfermedad mínima residual

La caracterización precisa de las enfermedades malignas hematológicas a nivel cromosómico y molecular ha avanzado mucho en los últimos años y actualmente supone una contribución importante a las decisiones terapéuticas iniciales. Por ejemplo, muchos pacientes con leucemia aguda, LMC y linfomas tienen lesiones cromosómicas específicas que se sabe que están asociadas con pronósticos favorables o desfavorables concretos, y la proporción de tales pacientes con lesiones cromosómicas definidas está aumentando. Habitualmente, la presencia de estas alteraciones citogenéticas puede confirmarse mediante técnicas de biología molecular que, en algunos casos, pueden ser más informativas que la citogenética.

El cromosoma Philadelphia (Ph) (22q-) presente en el 95% de los casos de LMC puede identificarse mediante estudios citogenéticos de rutina; su presencia puede confirmarse demostrando la presencia del gen de fusión *BCR-ABL* mediante PCR-TR. El cromosoma Ph puede también hallarse en el 25 y en el 5% de los adultos y niños con LLA respectivamente[26], donde se asocia con un pronóstico relativamente peor e indica la necesidad de una terapia más agresiva. En los pacientes en quienes se sospecha LMC o trastorno mieloproliferativo debe evaluarse si presentan el gen de fusión *BCR-ABL* para poder realizar un diagnóstico definitivo.

Para optimizar el manejo clínico, los pacientes con LLA deberían también ser evaluados para *BCR-ABL*.

Las células linfoides hendidas pequeñas son observadas en varias enfermedades con tratamientos y pronósticos diferentes. En tales casos, la detección de una translocación que afecta a *BCL-1* se asocia frecuentemente con un diagnóstico de linfoma de células del manto, t(11;14), mientras que la identificación de la implicación de *BCL-2* conlleva la existencia de un linfoma folicular, t(14;18)[27]. El primero es mucho más agresivo y se asocia con un pronóstico malo, requiriendo por tanto un tratamiento más intensivo. Las translocaciones asociadas con linfomas suelen conducir a una disregulación de un gen normal: por ejemplo, t(14;18) sitúa el gen *BCL-2* adyacente al gen de la IgH, lo que conduce a la disregulación del primero. En contraste, las translocaciones asociadas a la leucemia con frecuencia dan lugar a un gen quimérico que es transcrito, por ejemplo t(15;17), y que arroja un gen de fusión nuevo *PML/RARA*[28].

Frecuentemente, los puntos de corte dentro de la translocación tienen una distribución demasiado amplia para permitir la amplificación directa de ADN por PCR. En estos casos, el ARNm del gen de fusión puede transcribirse de forma inversa utilizando TR para generar un ADNc, que puede a continuación ser amplificado mediante PCR. Además, la PCR-TR es un instrumento exquisitamente sensible que ha sido explotado en la detección de la enfermedad residual. Está más allá del objeto de este capítulo describir el amplio intervalo de aplicaciones de estas técnicas, que han

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

sido revisadas en otra parte[29]. Ilustraremos su aplicación en el análisis del gen de fusión *BCR-ABL*.

Reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa BCR-ABL

Principio e interpretación

El análisis del gen de fusión *BCR-ABL* es realizado por una PCR-TR de dos fases. El ARN extraído de células nucleadas es tránscrito de forma inversa mediante TR para generar un codón o ADNc utilizando cebadores aleatorios de 6 pb, o hexámeros. Tras la fase de aplicación de la TR, las muestras son sometidas a PCR Multiplex, para evaluar la presencia o ausencia de *BCR-ABL*[30]. La PCR Multiplex es similar a la convencional pero incluye más de un par de cebadores en una única prueba de PCR. Esta estrategia potencia la detección de una gran mayoría de los tránscritos de *BCR-ABL*. Los tránscritos más frecuentemente observados son b3a2, b2a2 y e1a2, dando lugar a amplicones de 385, 310 y 481 pb, respectivamente (fig. 21.9).

Además del *BCR-ABL*, el gen *BCR* normal es coamplificado, dando lugar a un amplicón de 808 pb. La coamplificación de *BCR* es una indicación de la calidad de ARN y de la eficiencia de síntesis de ADNc. La ausencia de todos estos fragmentos indica un fallo en el procedimiento. Esto suele deberse a que la muestra es vieja (esto es, de más de 72 h). Para el análisis de PCR-TR, la muestra debe procesarse en un estadio de lisado (v. preparación de lisado nuclear, pág. 503) dentro de las primeras 48 h de su recogida. Además, el fragmento *BCR* no suele observarse en muestras diagnósticas donde *BCR-ABL* se amplifica de forma preferente.

Si *BCR-ABL* es indetectable por PCR Multiplex en muestras de seguimiento de pacientes que siguen tratamiento, el ADNc es evaluado con un mayor nivel de sensibilidad mediante PCR anidada[31]. La PCR anidada posibilita la detección de una célula leucémica en un grupo de 10^5 a 10^6 normales. La selección de cebadores para la PCR anidada depende del tipo de tránscrito detectado inicialmente por la PCR Multiplex. Los cebadores para b3a2 y b2a2 son los mismos; sin embargo para el tránscrito e1a2 se utiliza un conjunto diferente de cebadores. La PCR anidada produce fragmentos de 385 pb (b3a2), 310 pb (b2a2) o 481 pb (e1a2) de longitud. La PCR anidada no está indicada para evaluar el ADNc de un paciente con sospecha de padecer una LMC. El diagnóstico se realiza por la expresión de *BCR-ABL* mediante PCR Multiplex. Además, en muestras posteriores al tratamiento este hallazgo indicaría una recaída molecular.

Reactivos y métodos

Véase el apéndice E, en la página 502.

Monitorización de la enfermedad mínima residual

El manejo clínico efectivo de las enfermedades hematológicas malignas depende de una medición precisa y adecua-

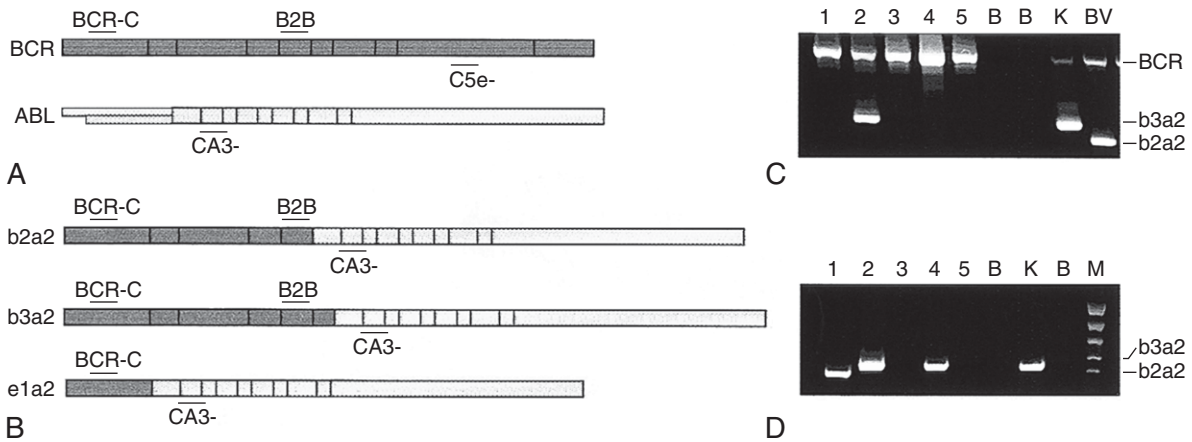


Figura 21.9. Detección de enfermedad mínima residual en la leucemia mieloide crónica (LMC) por la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (PCR-TR). A: Representación diagramática de los exones procesados de los genes *BCR* y *ABL* junto con la posición relativa de B2B y C5e—cebadores utilizados para coamplificar *BCR* en la PCR Multiplex. B: Derivados *BCR-ABL* frecuentemente observados, b2a2 y b3a2, los cuales dan lugar a p210 *BCR–ABL*, y e1a2, que da lugar a p190 *BCR–ABL*. Se muestran las posiciones relativas de los cebadores utilizados para amplificar los tránscritos quiméricos y la PCR Multiplex. C: Gel de agarosa al 2,0% agarosa con bromuro de etidio mediante el que se realizó la electroforesis de amplicones generados por PCR Multiplex utilizando ADN complementarios (ADNc) de 5 pacientes (carriles 1 a 5). El fragmento *BCR* normal coamplificado, de 808 pb de longitud, se observa en todas las muestras excepto en los carriles que contienen los controles (B). La muestra diagnosticada de un paciente con sospecha de LMC, en el carril 2, reveló un fragmento correspondiente al tránscrito *BCR-ABL* b3a2, 385 pb de longitud, además del amplicón *BCR*. El *BCR–ABL* no es detectable en los carriles 1, 3, 4 y 5, que contienen muestras de seguimiento de pacientes sometidos a trasplante de células madre (TCM). D: El ADNc de estos individuos fue sometido a una PCR anidada para excluir enfermedad residual. Ésta revela los tránscritos *BCR–ABL*, b3a2 (385 pb) y b2a2 (310 pb) en los carriles 1 y 4, previamente indetectables para la PCR Multiplex menos sensible. Sin embargo, *BCR–ABL* no es detectable en los carriles 3 y 5, lo que implica que estas muestras son de pacientes en remisión molecular tras el TCM. B, controles; K (K562-b3a2) y BV (BV173-b2a2), controles positivos; M, marcador de tamaño molecular.

da de la respuesta de un paciente a los agentes terapéuticos. Esto incluye el examen de la morfología celular en sangre periférica y especímenes de médula ósea. Aunque estos estudios son esenciales, carecen de suficiente sensibilidad; por tanto, el clon maligno ha avanzado con frecuencia a niveles en los que es refractario a nuevos tratamientos antes de que se detecte la recaída. En las últimas tres décadas hemos asistido a un notorio avance en el desarrollo de la tecnología para monitorizar la respuesta de los pacientes al tratamiento a una sensibilidad de 1×10^{-5} (esto es, la detección de una célula maligna en un grupo de 100.000 células normales). Para favorecer este hecho, es esencial contar con un marcador específico de enfermedad, como viene ilustrado por la objetivación del gen de fusión *BCR-ABL*, el cual mapea el cromosoma Philadelphia asociado a la LMC. El objetivo principal es detectar y medir la existencia de enfermedad mínima residual (EMR) utilizando las técnicas más sensibles disponibles en un laboratorio clínico de forma adecuada y precisa y, por tanto, reconocer signos precoces de recaída. La utilidad clínica de tales estudios ha sido ampliamente confirmada por la medición rigurosa y regular de EMR en pacientes con LMC. Esto está demostrando cada vez más ser aplicable a otras leucemias infantiles y del adulto utilizando marcadores específicos de enfermedad.

Con el propósito de aportar mayor claridad y debido a la limitación de espacio, el principio y los objetivos de los estudios sobre EMR se limitarán a la LMC. Aunque la PCR cualitativa (esto es, PCR Multiplex y anidada; v. pág. 490) es muy útil, no proporciona información acerca de la cinética de la enfermedad. Esta última puede obtenerse sólo midiendo la carga tumoral; ello se consigue por la cuantificación del ARNm de *BCR-ABL*. Varios grupos desarrollaron una estrategia de PCR-TR competitiva semicuantitativa para cuantificar *BCR-ABL* en relación con un gen de control endógeno para solventar esta dificultad. Una descripción detallada de la PCR competitiva está más allá del objetivo de este libro. En resumen, la PCR competitiva implica la coamplificación del gen diana y de un competidor de un número de copias en concentraciones variables. El número de tránscritos de *BCR-ABL* se estima determinando la concentración a la cual se alcanza la equivalencia entre la diana y el competidor[32].

Debido a que la cantidad de ARN total añadida a cada reacción de transcripción inversa y su cualidad (esto es, el grado de degradación) son variables, los tránscritos de un gen doméstico son cuantificados como un control endógeno. Además, la amplificación de un gen control endógeno también tiene en cuenta la variabilidad de la dinámica PCR intermuestra. Existe un número de genes control que pueden ser utilizados como genes de control endógeno (p. ej., *GAPDH*, β_2-microglobulina y *ABL*). Un gen de control endógeno no debería ser altamente expresado ni debería mostrar variación entre muestras en los niveles de expresión; además, no debería haber seudogenes relacionados ni «empalmes» alternativos[33]. Sin embargo, la complejidad y la gran extensión de los ensayos con PCR competitiva limitan su uso a centros especializados. La introducción de PCR cuantitativa en tiempo real (PCR-QR) en el final del último milenio hizo la cuantificación de EMR más ampliamente accesible. La PCR-QR es lineal sobre cinco órdenes de magnitud en contraste con el corto intervalo de linealidad de la PCR competitiva.

Principio

La PCR-QR permite la cuantificación de un número de tránscritos de genes de interés con altos niveles de sensibilidad. Esto se consigue desarrollando la tecnología que permite la detección de productos de la PCR conforme se acumulan. Además, la tasa de acumulación es proporcional al número de moléculas de ARNm del gen diana en el material de inicio durante la fase exponencial de la PCR. La acumulación de amplicones es detectada mediante la inclusión de una sonda específica de secuencia marcada con fluorocromos junto a los cebadores como en una PCR convencional (fig. 21.10). Desde el advenimiento de la PCR-QR se han desarrollado varios tipos de sondas, aunque todas dependientes del principio de transferencia energética de fluorescencia por resonancia (FRET). Los dos sistemas utilizados más frecuentemente son la hibridación o la hidrólisis de la sonda. Una metodología ampliamente utilizada es la TaqMan, que implica la hidrólisis de la sonda[34]. Esta tecnología se basa en el ensayo de la 5′exonucleasa, que explota la actividad exonucleasa 5′3′ inherente de la ADN Taq polimerasa[35]. La ADN Taq polimerasa rompe una sonda con doble marcado anidada a la secuencia diana durante la amplificación con PCR (fig. 21.11A). En resumen, el ADNc sintetizado a partir del ARN total es añadido a la mezcla de reacción de PCR que contiene los componentes de PCR estándar más una sonda que se anida al molde entre los dos cebadores como en una PCR convencional. La sonda tiene un marcador fluorescente indicador o *reporter*, FAM, en el extremo 5′ (6′carboxifluoresceína; emisión λ_{max} = 518 nm) y un marcador extintor o *quencher*, TAMRA, en el extremo 3′ (6-carboxitetrametilrodamina; emisión λ_{max} = 582 nm). Mientras la sonda está intacta, la proximidad del marcador extintor reduce en gran medida la fluorescencia emitida por el marcador indicador en virtud de un proceso de transferencia de energía por resonancia Forster (FRET)[36] a través del espacio. Se observa una extinción adecuada para sondas con un marcador indicador en el extremo 5′ y un marcador extintor en el extremo 3′.

Por consiguiente, mientras que el TAMRA y el FAM están íntimamente ligados a la sonda, la fluorescencia del marcador indicador es extinguida por el TAMRA. Durante la PCR, como la ADN Taq polimerasa replica la cadena de ADN a la que la sonda TaqMan está hibridada, la sonda es degradada por la actividad de la exonucleasa intrínseca 5′-3′ de la polimerasa. El efecto es la disociación del FAM del TAMRA; por tanto, la FRET queda interrumpida y la fluorescencia de la FAM puede detectarse con un láser integrado en el secuenciador (TaqMan ABI 7700 Sequence Detection system, Applied Biosystems, Foster City, CA). La fluorescencia aumenta, en cada ciclo, de forma proporcional a la tasa de degradación de la sonda. El nú-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

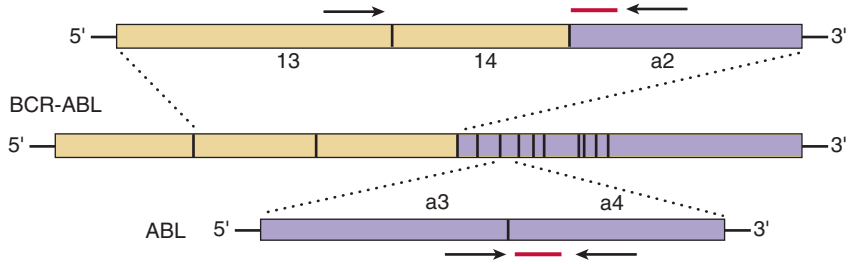


Figura 21.10. Sondas y cebadores. Se muestra la posición de sondas y cebadores utilizados para la cuantificación de tránscritos de *BCR-ABL* y *ABL*. El gen de fusión *BCR-ABL* se muestra en las cajas amarilla y púrpura, representando la amarilla los exones derivados del gen *BCR* y el púrpura aquéllos originados del gen *ABL*. Las sondas con marcado dual se muestran como líneas rojas y los cebadores se señalan con flechas. Las sondas y cebadores se diseñaron utilizando el Primer Express Software para detectar las uniones e13a2 y e14a2 en una reacción única mediante PCR-QR. Las sondas de *BCR-ABL* (FAM-cccttcagcggccagtagcatctga-TAMRA) y *ABL* (FAM-tgcttctgatggcaagctctacgtctcct-TAMRA) son marcadas de forma dual con 6-carboxifluoresceína (FAM) y 6-carboxi-tetrametil-rodamina (TAMRA). Cebador directo *BCR–ABL*: 5′-tccgctgaccatcaayaagga-3′; cebador inverso *BCR-ABL*; 5′-cactcagaccctgaggctcaa-3′; cebador directo *ABL*: 5′-gatacgaagggagggtgtacca-3′; cebador inverso *ABL*: 5′ctcggccagggtgttgaa-3′. La sonda y el cebador *BCR-ABL* fueron diseñados en asociación con el estudio Europe Against Cancer Collaborative.

mero de ciclos necesario para que la fluorescencia cruce un valor umbral de ×10 la desviación estándar de la emisión basal se utiliza para la medición cuantitativa. El umbral está situado significativamente por encima de la línea basal y puede ajustarse manualmente. Un incremento significativo de la fluorescencia por encima del valor basal durante los ciclos 3-15 indica la detección del producto PCR acumulado. El límite basal superior puede ser modificado por el técnico. La fluorescencia es representada gráficamente como δRN contra el número de ciclos (es decir, tiempo; fig. 21.11B). El δRN es δRN = (Rn^+)-(Rn^-). Como referencia pasiva, la ROX (6-carboxi-X-rodamina) está incluida en la Q-PCR Universal Master Mix. Las fórmulas utilizadas para calcular la Rn^+ y Rn^- son las siguientes:

De la PCR con molde:

$$Rn^+ = \frac{\text{Intensidad de emisión del indicador}}{\text{Intensidad de emisión de la referencia pasiva (ROX)}}$$

Y de la PCR sin molde o ciclos previos de PCR:

$$Rn^- = \frac{\text{Intensidad de emisión del indicador}}{\text{Intensidad de emisión de la referencia pasiva (ROX)}}$$

El número de ciclos necesarios para alcanzar la detección de fluorescencia se denomina valor umbral de ciclos (Ct) y es inversamente proporcional al material de inicio de la diana. El número de tránscritos del gen diana es leído a partir de una curva estándar. Los tránscritos del gen diana y del gen control endógeno son medidos a partir de las respectivas curvas estándar. El nivel de expresión del gen diana se expresa como una razón de porcentajes para obtener un valor normalizado para el gen de interés, independientemente de la integridad del ARN y de la eficiencia de la reacción de transcripción inversa.

Interpretación

Los pacientes que alcanzan una remisión citogenética completa pueden albergar hasta 1×10^{10} células leucémicas. La cinética de la carga leucémica en estos pacientes y su respuesta a los agentes terapéuticos sólo puede monitorizarse midiendo la EMR[37]. Aunque debe reseñarse que los pacientes en los que la PCR-QR no detecta la *BCR-ABL* puede aún albergar hasta 1×10^6 células leucémicas. De aquellos que se encuentran en fase de remisión citogenética completa, la relación *BCR-ABL/ABL* es invariablemente inferior al 2,0%. Ciertos investigadores han comunicado también que los pacientes que alcanzan relaciones *BCR-ABL/BL* inferiores al 0,045% mientras reciben tratamiento con interferón α tienen un riesgo considerablemente reducido de recaída citogenética y, por consiguiente, podría reducirse o retirarse la quimioterapia a estos individuos[38]. Por tanto, con una monitorización estrecha de la EMR es posible reducir o evitar la exposición innecesaria de los pacientes a fármacos tóxicos. Más recientemente, la PCR-Q ha sido utilizada para monitorizar a pacientes que están siendo tratados con mesilato de imatinib. Los resultados preliminares de un estudio multicéntrico internacional indican que una reducción de 3 log en las copias de *BCR-ABL* se asocia con un buen pronóstico[39]. La cuantificación de *BCR-ABL* también ayuda a identificar pacientes en riesgo de recaída, y por tanto proporciona una ventana para la intervención clínica precoz con el objetivo de revertir la progresión de la enfermedad. Para los pacientes que han sido sometidos a trasplante de células madre (TCM) esto invariablemente significa la infusión de linfocitos aislados a partir del donante original (esto es, inmunoterapia adoptiva). Aunque existe cierto debate sobre los criterios precisos de recaída molecular, hay pocas dudas acerca de que un incremento de 1 log confirmado en los tránscritos de *BCR-ABL* es clínicamente significativo (esto es, desde 0,002% hasta 0,02%). Los pacientes que alcanzan una relación de *BCR-ABL/ABL* de un 0,02% en tres ocasiones consecutivas se dice que presentan una recaída molecular.

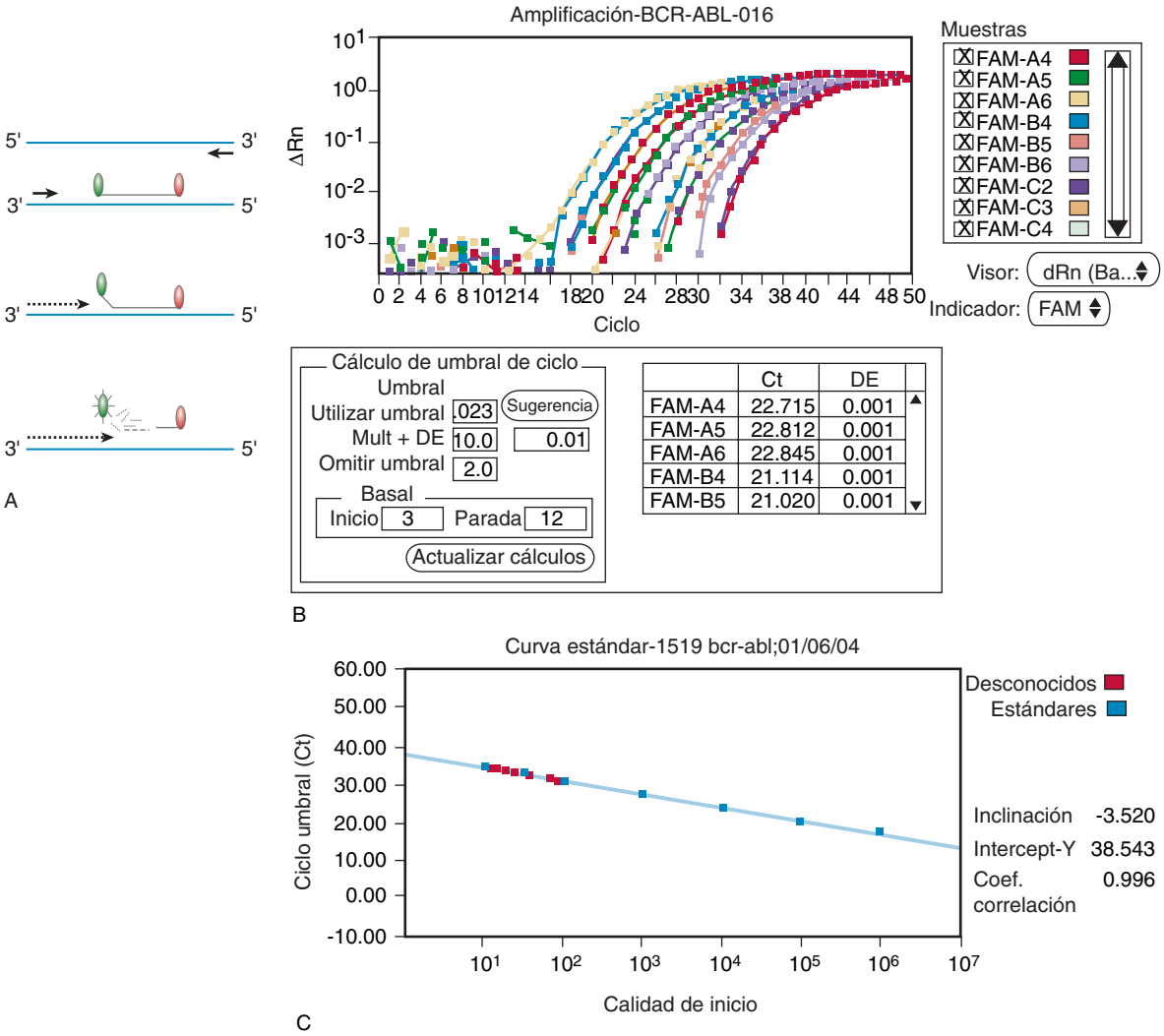


Figura 21.11. Reacción de cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (PCR-QR). A: Representación esquemática del principio de la PCR en tiempo real. Los cebadores directo e inverso *(líneas azules)* son extendidos tanto por la Taq ADN polimerasa como por la PCR convencional. El extintor *(símbolo rojo)* suprime la fluorescencia del indicador *(símbolo verde)* mientras ambos están unidos a la sonda. Conforme el cebador directo se extiende, la sonda es desplazada y es cortada por la actividad exonucleasa de la Taq ADN polimerasa 5′–3′. La fluorescencia se detecta una vez que el indicador se disocia del extintor quedando la sonda degradada y completándose la síntesis del nuevo ADN. Por tanto, la fluorescencia se incrementa conforme crece el número de amplicones. B: Gráfico de amplificación. Se muestra el gráfico de amplificación de la PCR en tiempo real de los estándares en incrementos logarítmicos. Se incluye log 0,5 estándares entre 10 y 100 copias de *BCR–ABL*. El número de ciclos para que la fluorescencia sobrepase el umbral se expresa como Ct (valor umbral de ciclos). Cuanto mayor es el número de copias, menor es el valor Ct (es decir, es inversamente proporcional). C: Curva estándar. Se muestra una curva estándar obtenida a partir de los datos de PCR-Q de diluciones seriadas de plásmidos que contenían *BCR-ABL (símbolos negros)*. Los tránscritos *BCR-ABL* para las muestras desconocidas *(símbolos rojos)* se deducen a partir de la curva estándar.

Ventajas de la PCR-QR

La mayor ventaja de la PCR-QR es su capacidad para detectar la acumulación de amplicones durante la fase exponencial de la PCR. Esto permite la cuantificación del ADN de interés en el material de arranque. Esto no es posible con la PCR convencional porque las muestras son analizadas al final de la realización de la PCR y, por tanto, cualquier diferencia en el número de copias entre muestras en el material inicial no suele ser fácil de detectar. Esto se ilustra en el gráfico de amplificación en la figura 21.11B, donde todas las muestras al final de 50 ciclos tienen el mismo nivel de fluorescencia, a pesar de tener un número variable de copias diana en el material de inicio como se observa en la fase exponencial de la PCR. La manipulación posterior a la PCR se elimina; al completar el ensayo la microrrejilla sellada se descarta y, por tanto, se minimiza el riesgo de contaminación. Esto también elimina la necesidad de manejar gel teñido con bromuro de etidio, que es carcinogénico, al completar el ensayo de PCR-QR. La PCR-QR ofrece un nivel superior de especificidad ya que, además de que los cebadores se hibriden a la secuencia ADN de interés, un tercer oligonucleótido (la sonda) se hibrida a

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

la región comprendida entre los cebadores a una temperatura superior. Para alcanzar un nivel de sensibilidad similar al de la PCR-QR, se requiere realizar una PCR anidada convencional, pero ésta se asocia a un mayor riesgo de contaminación. La PCR convencional es también menos susceptible de automatizarse. Lo que es más importante, dado que la PCR-QR puede ser automatizada, la estandarización interlaboratorios se hace factible cuando se valora la respuesta de los pacientes al tratamiento. Esto permite una rápida evaluación de nuevas modalidades terapéuticas ya que la metodología y los protocolos pueden estandarizarse, permitiendo la realización de estudios interlaboratorio internacionales.

Reactivos y métodos

Véase el apéndice F, página 504.

Trastornos linfoproliferativos

La mayoría de trastornos linfoproliferativos pueden ser fácilmente diagnosticados utilizando técnicas citoquímicas e inmunológicas, como se describió en los capítulos 13 y 14. Sin embargo, en la monitorización de la enfermedad residual, y en ciertos casos en los que el diagnóstico es ambiguo, las técnicas genéticas pueden ser útiles[29,40]. Ejemplos de estas aplicaciones son los casos de linaje controvertido, linfomas en los que la histología es ambigua y linfomas ocultos. El análisis de ADN puede también ayudar a la hora de determinar si una linfocitosis es monoclonal, oligoclonal o policlonal. En estos trastornos se dan translocaciones y éstas pueden utilizarse en la monitorización de la enfermedad, como se describió anteriormente para la LMC. Sin embargo, los marcadores más frecuentemente utilizados, debido a que son más aplicables de forma universal, son los reordenamientos de los genes de la inmunoglobulina (Ig) y del *TCR*.

Principio

Este análisis es posible debido a que los genes de Ig y *TCR* experimentan un reordenamiento durante la diferenciación normal de los linfocitos B y T, respectivamente, pero no durante la diferenciación de otras células. Este reordenamiento conduce a una fusión única de segmentos variables, diversos y de unión (VDJ), interdigitados por la inserción o deleción aleatoria de nucleótidos (región N). La secuencia y longitud del ADN en estos lugares de recombinación son por tanto característicos de cualquier clon concreto de linfocitos.

Durante muchos años, el análisis con manchado de Southern ha constituido el patrón oro para la detección de genes de Ig y *TCR* reordenados. Los fragmentos reordenados obtenidos mediante enzimas de restricción se detectan por ser diferentes en tamaño a los fragmentos de la línea germinal observados en las regiones de unión de estos loci. Sin embargo, los fragmentos reordenados a partir de cualquier clon sólo se detectan cuando representan una proporción anormalmente extensa de las células en la población que está siendo estudiada, como ocurrirá en un trastorno linfoproliferativo clonal. En una población policlonal, cada uno de los muchos fragmentos diferentes reordenados existentes, derivados de un amplio número de clones diferentes, estará por debajo del nivel de detección por este método. En esta situación sólo se observarán los fragmentos de la línea germinal. Las sondas más informativas utilizadas en los estudios de reordenamiento de genes son la sonda JH, para la región de unión del gen de la cadena pesada de Ig, y la sonda Cβ, para la región constante del gen de la cadena α del *TCR*. Para consultar los detalles sobre cómo se realizan e interpretan estos métodos, remitimos al lector a ediciones previas de este libro.

Más recientemente, debido a su simplicidad, la pequeña cantidad de ADN requerida y su potencial sensibilidad, se ha utilizado la PCR para detectar el reordenamiento de los genes de Ig y *TCR*. Debido a la diversidad en la región N, una población policlonal de células dará lugar a una escalera de diversos tamaños de fragmentos; sin embargo, si un clon se convierte en anormalmente extenso, un tamaño de fragmento determinado comenzará a predominar entre los productos de la PCR: esto es la base del llamado método de «huella dactilar» para el diagnóstico de trastornos linfoproliferativos[41]. Este análisis puede ser refinado utilizando un análisis heterodúplex o en geles de SSCP en los que la secuencia así como el tamaño del producto amplificado determinan su movilidad. Para ganar mayor sensibilidad en el seguimiento de la enfermedad, el producto de una amplificación «clonal» puede ser secuenciado para proporcionar una secuencia específica del clon del lugar de reordenamiento. Esta secuencia puede entonces utilizarse para el diseño de sondas de oligonucleótidos específicos de clon o cebadores que pueden utilizarse en la realización de ASOH, SMRA o PCR en tiempo real. Esta metodología ha sido utilizada para monitorizar la EMR en los trastornos linfoproliferativos[42,43].

Se ha publicado un estudio sobre el diseño y estandarización de los cebadores y de los protocolos de PCR en la detección de reordenamiento génico de Ig y *TCR*[40]. La tasa de detección de reordenamientos clonales es muy alta, pero la naturaleza exhaustiva de la prueba requiere 107 pares de cebadores en 18 tubos de PCR Multiplex, comercializados actualmente. Los métodos descritos aquí son más limitados pero de aplicación más generalizable

Método: reordenamiento de los genes de las inmunoglobulinas

Para estudiar el reordenamiento del gen de Ig, el lugar de elección es el gen de la cadena pesada. Se puede utilizar un cebador único, que se hibridará a una secuencia consenso compartida por todos los segmentos de unión (JH). La selección de cebadores de segmento variable (VH) es más difícil y, para realizar un análisis más exhaustivo, se utilizan los cebadores de las tres regiones marco para cada una de las seis o siete familias de VH[40]. Una actitud de inicio razonable, sin embargo, es utilizar el cebador JH junto con un cebador diferente derivado de una secuencia de consenso de la región 1 marco para cada familia de VH. Estos cebadores son los siguientes:

JH 5′ ACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT 3′
VH1 5′ CCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG 3′
VH2 5′ GAGTCTGGTCCTGCGCTGGTGAAA 3′
VH3 5′ GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA 3′
VH4 5′ TTCGGA(GC)ACCCTGTCCCTCACCT 3′
VH5 5′ AGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCT 3′
VH6 5′ CCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTG 3′

En estas reacciones se utiliza tampón para PCR tipo I, con una temperatura de hibridación de 60 °C. Los productos de las reacciones están en el orden de los 320 pb y pueden ser visualizados bien en forma de mancha o banda discreta en geles de agarosa gruesos. Sin embargo, se obtiene una mejor resolución cuando los productos se analizan sobre un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 6% (v. apéndice C, pág. 501). Los productos pueden ser visualizados mediante tinción con bromuro de etidio, autorradiografía (si se incluyen trazas de [α^{32}P] dCTP en la reacción de PCR) o tinción con plata[44]. En caso de tener acceso a un analizador de fragmentos automatizado (p. ej., el ABI 3700 ADN Analyser), este método es fácilmente transformado mediante la unión de un marcador fluorescente al cebador JH y leyendo los picos de fluorescencia como un «GeneScan». De forma alternativa, los productos de la PCR pueden ser sometidos a análisis de heterodúplex o SSCP, desnaturalizándolos a 95 °C durante 5 min e hibridando en hielo durante 1 h, previamente a la realización de una electroforesis en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 6% (v. apéndice C, pág. 501).

Interpretación

Debido al número variable de nucleótidos ya eliminados o añadidos al punto de unión de los segmentos VDJ del gen de la cadena pesada de inmunoglobulinas, la distancia entre los cebadores de segmento V y segmento J se alterará de forma concordante. Para que el gen sea funcional, el marco de lectura debe mantenerse, y por tanto las variaciones en longitud deben ser múltiplos de 3 pb. La población policlonal de células B, por tanto, da lugar a una distribución característica en forma de «escalera» o de tipo Gauss, con un pico de intensidad observado en el punto de la mediana en su centro. Si un clon de células B es anormalmente extenso, generará una banda desproporcionadamente intensa en el tamaño (y utilizando un cebador V de la familia apropiada) correspondiente a su longitud VDJ. En la presentación de una enfermedad maligna de células B, esta banda puede ser la única visible, lo que confirma la presencia de un clon anormal de células B. Consiguientemente, una intensidad anormal de este tamaño de fragmento en el contexto general de una imagen en forma de escalera puede servir para monitorizar la enfermedad.

En el análisis de heterodúplex o SSCP, la población policlonal de células B dará lugar a fragmentos con muchas secuencias diferentes, las cuales, a través de la desnaturalización y de la rehibridación, generarán heterodúplex que aparecerán como manchas que se diseminan a lo largo del gel. Sin embargo, si hay un extenso clon de células B se formarán homodúplex y éstos migrarán como un fragmento discreto con una migración que será compatible solamente con su tamaño. Existen otros dos problemas importantes que pueden encontrarse en este análisis. El primero es que los cebadores V de consenso pueden no amplificar todos los segmentos V debido a variaciones en las secuencias. Esto es especialmente cierto para los linfomas de células B extensos difusos y para mielomas que pueden albergar muchas mutaciones somáticas. En segundo lugar, la evolución de un clon de células B o la emergencia de otros subclones durante el curso de la enfermedad pueden conducir a un cambio en el tamaño y la familia del fragmento.

Método: reordenamiento de los genes de los receptores de células T

El locus de elección para el análisis por PCR del reordenamiento del gen TCR es el locus γ del TCR ya que experimenta reordenamiento en la gran mayoría de los clones de células T y no tiene la complejidad del locus β del TCR, que presenta 24 familias diferentes de segmentos V. La amplificación del ADN alrededor de la región de unión del gen TCR gamma es llevada a cabo de forma similar a la descrita antes para el locus IgH, utilizando un cebador de consenso para el segmento de unión (JγC) y uno para cada uno de las cuatro familias de segmentos variables (Vγ1–4). Las secuencias de los cebadores son las siguientes:

JγC: 5′ CAACAAGTGTTGTTCCAC 3′
Vγ1: 5′ TGCAGCCAGTCAGAAATCTTCC 3′
Vγ2: 5′ TGCAGGTCACCTAGAGCAACCT 3′
Vγ3: 5′ AGCAGTTCCAGCTATCCATTTCC 3′
Vγ4: 5′ TGCAATTGCACTTGGGCAGTTG 3′

Las condiciones de amplificación estándar mediante PCR pueden emplearse utilizando estas combinaciones de cebadores, y los análisis se realizan también en geles de acrilamida (v. apéndice C, pág. 501) o con un analizador de fluorescencia automático.

Interpretación

Como en el análisis del gen de la cadena pesada de inmunoglobulinas, se obtienen bandas discretas de producto amplificado a partir de poblaciones de células T clonales, mientras que de las poblaciones policlonales se obtienen manchas. En los geles SSCP en los que la movilidad de los fragmentos queda determinada tanto por la secuencia como por el tamaño puede conseguirse una mayor resolución. Los productos de una población policlonal tienen una gran variedad de secuencias y, después de la desnaturalización, no se rehibridan con facilidad para generar el producto de doble cadena, sino que migran en forma de una mancha larga de productos de cadena única. Si existe un clon de células T extenso, habrá muchas copias del mismo producto; estas copias se rehibridarán para generar un fragmento de doble cadena, y aparecerán como fragmentos de cadena única individualizados (fig. 21.12).

El principal problema con la interpretación de esta clase de datos es que no distingue los clones de células T reacti-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

vas de los clones de células T malignas. Se pueden distinguir con claridad tres patrones diferentes: una población clonal maligna extensa, una población oligoclonal y una población policlonal. Sin embargo, como consecuencia de la sensibilidad de este método, pueden surgir problemas en el intento de detectar un clon maligno pequeño contra una población policlonal en comparación con una población clonal estimulada por antígenos, especialmente cuando el paciente está linfopénico.

ESTUDIOS DE QUIMERISMO DONANTE-RECEPTOR

Tras los trasplantes de células madre alogénicas es importante monitorizar el injerto de células del donante en el huésped. Esto puede conseguirse de distintas formas; una de ellas es la utilización de marcadores de ADN. El método de elección es la amplificación por PCR de los loci STR, los cuales, debido a su naturaleza altamente polimórfica, es probable que aporten diferencias informativas entre cualquier par de donante-receptor[45].

Principio

Sólo si el número de ciclos de amplificación se mantiene razonablemente bajo (25 ciclos) la reacción PCR es semicuantitativa, y la cantidad de producto reflejará la cantidad de material de partida. Por tanto, una vez que se ha establecido una diferencia informativa, la cantidad de producto PCR de los diferentes alelos del donante y del receptor reflejarán la proporción de ADN de uno y otro en la muestra. Los cebadores marcados con fluorescencia se aplican en reacciones de PCR Multiplex que se llevan a cabo en un analizador genético basado en la capilaridad.

Método

Este método ha sido modificado a partir del trabajo de Mann y cols.[46] por Griffiths y Mason (comunicación personal). Se utilizan cinco pares de iniciadores, como se enumera en la tabla 21.3. Las reacciones de PCR se llevan a cabo utilizando tampón tipo III con 1,5 mM de $MgCl_2$. Las condiciones de amplificación son 94 °C durante 5 min, luego 25 ciclos a 94 °C durante 30 s, 57 °C durante 1 min y 72 °C durante 2 min, lo que irá seguido de una extensión a 72 °C durante 5 min. No se utiliza aceite cuando los productos van a estudiarse en el analizador de ADN. Un microlitro de producto PCR, que puede necesitar diluirse de 1:4 a 1:10 en agua, se añade a 10 µl de formamida que contenga el marcador de tamaño Rox 500 (7,5 µl diluidos en 500 µl de formamida), en partes alícuotas sobre una placa óptica de 96 pocillos para PCR y procedimiento analítico en el analizador ABI 3700 ADN (o equivalente). Los picos que representan los fragmentos de ADN se visualizan con el software del genotipificador (ABI).

Interpretación

Comparando las muestras de ADN del receptor (pretrasplante) y del donante, se busca una diferencia informativa en uno o más de los loci STR tal que los alelos específicos del receptor-específicos y/o específicos del donante se identifiquen. Se establecen factores de corrección comparando las alturas pico relativas de los dos alelos de receptor y donante en estos STR. Después del trasplante, se registra el área bajo cada pico informativo y se utiliza para evaluar la proporción relativa de ADN del donante y del receptor. Se ofrecen ejemplos de injerto total y quimerismo mixto en la figura 21.13.

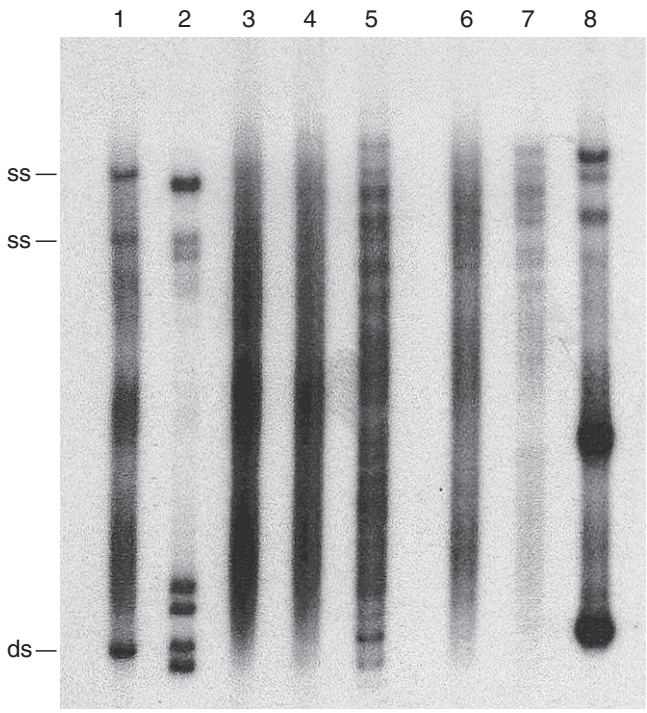


Figura 21.12. Análisis de poliformismos de conformación de cadena sencilla (SSCP) en los reordenamientos de receptores de células T (TCR) y de cadena γ. Electroforesis de productos desnaturalizados y radiomarcados de la reacción en cadena de la polimerasa en un gel de poliacrilamida nativa al 6%, visualizada mediante autorradiografía. Fragmentos discretos de cadena sencilla (cs) y doble- (cd), que indican la presencia de clones de células T anormales, observados en los carriles 1, 2 y 8 de pacientes con hipereosinofilia, linfoma cutáneo de células T y linfoma γδ. Se observan lincajes policlonales de fragmentos de cadena única en los carriles 3, 4 y 6, y múltiples fragmentos de cadena única contra un manchado de fondo observado en los carriles 5 y 7, lo que indica una expansión oligoclonal de clones de células T.

DÉFICIT DE GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA

La mayoría de las variantes polimórficas de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) que se han asociado a hemólisis aguda han sido definidas a nivel molecular, y puede ser importante distinguirlas de la variante de G6PD que es causa de una hemólisis crónica. Debido a que se trata de un trastorno ligado al cromosoma X, puede ser difícil identificar a las mujeres heterocigotas, en las que los niveles de

Tabla 21.3. Cebadores de PCR utilizados para amplificación Multiplex de STR

Marcador	Etiqueta	Secuencia cebador (5′-3′)	Concentración (μmol/l)
D13S634F	6-FAM	GGCAGATTCAAT CGGATAAATAGA	0,12
D13S634R	—	GTAACCCCTCAG GTTCTCAAGTCT	0,12
D18S386F	HEX	TGAGTCAGGAG AATCACTTGGAAC	0,2
D18S386R	—	CTCTTCCATGAA GTAGCTAAGCAG	0,2
D18S391F	HEX	TAGACTTCACTA TTCCCATCTGAG	0,12
D18S391R	—	TAGACTTCACTA TTCCCATCTGAG	0,12
FGAF	6FAM	CCATAGGTTTTG AACTCACAG	0,2
FGAR	—	CTTCTCAGATCC TCTGACAC	0,2
MBPF	6FAM	GGACCTCGTGAA TTACAATC	0,6
MBPR	—	ATTTACCTACCT GTTCATCC	0,6

PCR, reacción en cadena de la polimerasa; STR, repetición corta en tándem.

actividad enzimática pueden variar entre estar reducida hasta ser normal. Esto es especialmente importante en mujeres que sean familiares de hombres con anemia hemolítica crónica causada por una deficiencia en G6PD. Además, la deficiencia de G6PD puede quedar enmascarada por la existencia de reticulocitosis en individuos con hemólisis aguda (especialmente en individuos con una variante A) y en neonatos.

En tales casos, puede ser beneficioso evaluar la variante de deficiencia de G6PD mediante análisis de ADN. Aunque se han descrito hasta ahora más de 100 mutaciones en la G6PD[47], algunas de las variantes de deficiencia más comunes son rápidamente diagnosticadas mediante digestión con enzimas de restricción de los productos PCR adecuados. Por ejemplo, la mutación mediterránea en la G6PD crea un sitio Mbo II en el exón 6, y las dos mutaciones halladas en la G6PD A crean un Nla III en el exón 4 y un Fok I en el exón 5 del gen de la G6PD (v. también cap. 10, páginas 186-187.)

APÉNDICES: MÉTODOS TÉCNICOS

Apéndice A. Extracción del ADN genómico

Reactivos

Nota general. Para todos los tampones y soluciones que se describen en este capítulo, se recomienda que se utilicen reactivos de la más alta calidad y agua desionizada bidestilada.

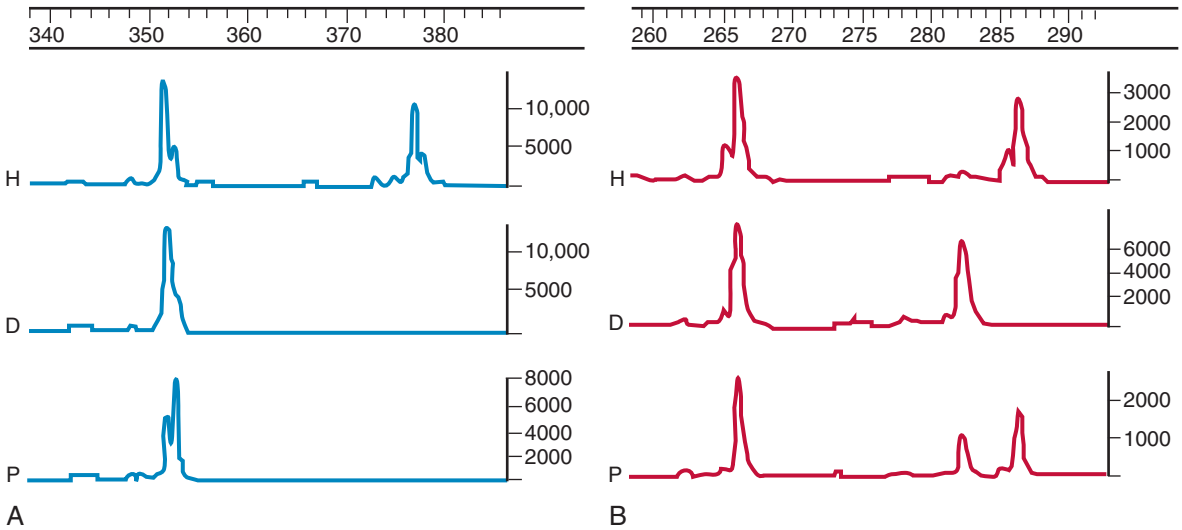


Figura 21.13. Análisis de repeticiones cortas en tándem (STR) en un injerto de médula ósea. Electroforesis capilar de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tras amplificación de STR como se observa en el Genotyper Software. R, ADN receptor; D, ADN donante; P, ADN postrasplante. Panel A: el receptor y el donante comparten un alelo a 352 pb, mientras que se observa un alelo específico del receptor a 376 pb con el marcador D18S386; el último no es detectado en la muestra postrasplante. Panel B: el receptor y el donante comparten un alelo en 266 pb pero tienen alelos específicos a 286 y 282 pb, respectivamente. Los tres alelos se observan en un ADN postrasplante, lo que indica que la muestra es quimérica. A partir del área relativa bajo los picos específicos de receptor y donante, la proporción de ADN donante se estimó en un 39%.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Soluciones madre

NaCl 5 mol/l. Pesar 146,1 g de NaCl, poner en una probeta y rellenar volumen hasta 500 ml con agua; remover hasta que se disuelva.

Tris-HCl, 1 mol/l, pH 8,5. Disolver 60,5 g de Trizma base (tris[hidroxi]metilaminometano) en 350 ml de agua; añadir HCl concentrado hasta que el pH caiga a 8,5; rellenar hasta 500 ml con agua.

Tris-HCl, 1 mol/l, pH 7,4. Preparar como en el punto anterior, pero reducir el pH a 7,4 con HCl.

NaOH, 5 mol/l. Añadir 200 g de NaOH a 800 ml de agua y remover hasta disolverlo; rellenar hasta 1 l con agua.

EDTA, 0,5 mol/l, pH 8,0. Medir 93 g de sal disódica (dihidrato) de EDTA y añadir a 400 ml de agua; remover hasta que la mayor parte se haya disuelto. Añadir 0,5 mol/l de NaOH hasta que el pH ascienda a 8,0, momento en que el resto del sólido debe empezar a disolverse. Rellenar hasta 500 ml con agua.

Solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,3. Véase página 588 para la preparación.

Nonidet P-40 (NP40), 10%. Añadir 10 ml de NP40 a 90 ml de agua y mezclar bien.

Dodecil sulfato de sodio (SDS, lauril sulfato), 20%. Medir 100 g de SDS y añadir a 350 ml de agua. Remover y calentar a 65 °C hasta conseguir disolver y rellenar hasta 500 ml con agua. **Atención: el SDS irrita las vías respiratorias. Llevar máscara facial y pesar en una campana de humos.**

Soluciones de trabajo

PBS + NP40 al 0,1%. Añadir 5 ml de NP40 al 10% a 495 ml de PBS.

Tampón de lisis diez veces concentrado (×10). Mezclar 60 ml de NaCl 5 mol/l, 20 ml de 0,5 mol/l EDTA, 10 ml de 1 mol/l Tris pH 7,4 y 10 ml de agua para dar 100 ml de 3 mol/l de NaCl, 100 mmol/l EDTA, y 100 mmol/l Tris.

Solución de lisis. Preparar una cantidad adecuada de esta solución fresca cada vez; para 50 ml pesar 21 g de urea (7 mol/l), añadir 5 ml de tampón de lisis ×10 y rellenar hasta un volumen final de 50 ml con agua.

Cloroformo/alcohol isoamilo (24:1). Añadir 20 ml de alcohol isoamilo a 480 ml de cloroformo.

Etanol al 70%. Añadir 30 ml de agua a 70 ml de etanol puro.

Tris EDTA (TE) (10 mmol/l Tris, 1 mmol/l EDTA). Añadir 5 ml de Tris 1 mol/l a pH 7,4 y 1 ml de 0,5 mol/l Na_2 EDTA a 494 ml de agua.

Fenol equilibrado con TE. La naturaleza del fenol es crucial para asegurar la calidad del ADN obtenido. El ADN es soluble en fenol saturado con agua en pH ácido, y por tanto es necesario equilibrarlo hasta un pH neutro.

1. Tomar 500 ml de fenol saturado con agua. Preparar 500 ml de Tris, 0,5 mol/l, pH 8,5, añadir 150 ml de esta mezcla al fenol, y mezclar por inversión durante 2-3 min. Dejar en reposo hasta que las fases acuosa y orgánica se hayan separado.
2. Eliminar y descartar la capa acuosa superior. Añadir otros 125 ml de 0,5 mol/l Tris, mezclar, dejar reposar, eliminar la capa acuosa como antes, y a continuación repetir.
3. A los restantes 100 ml de 0,5 mol/l Tris, añadir 400 ml de agua para alcanzar 500 ml de 0,1 mol/l Tris. Añadir 150 ml de esta mezcla al fenol, y a continuación mezclar, dejar reposar y eliminar. Repetir dos veces más.
4. A los restantes 50 ml de 0,1 mol/l Tris añadir 449 ml de agua y 1 ml de EDTA al 0,5 mol/l para generar 500 ml de TE. Añadir, mezclar, dejar reposar y eliminar éste en tres estadios como se describió antes. El fenol se habrá reducido en volumen durante este procedimiento pero el TE estará equilibrado y listo para usarse.

Método

1. Congelar una muestra de sangre anticoagulada a –20 °C. El EDTA es el anticoagulante de elección. Es conveniente recoger la sangre en un tubo que pueda ser centrifugado, como, por ejemplo, un contenedor universal desechable plástico de 25 ml. Cualquier tamaño de muestra entre 2 y 20 ml será satisfactorio. La sangre puede enviarse a un laboratorio de referencia a temperatura ambiente, preferiblemente en los días siguientes a la extracción. La muestra puede ser almacenada a –20 °C durante varias semanas; el almacenamiento durante períodos superiores es mejor a –80 °C.
2. Descongelar la sangre y centrifugar a 700 g durante 15 min. Desechar con cuidado el sobrenadante. El sedimento puede ser difícil de ver en este estadio y puede ser bastante friable.
3. Volver a suspender el sedimento en 1-2 ml de PBS +0,1% NP40 mezclando en una pipeta plástica de transferencia estándar de calibre ancho. Completar la suspensión hasta el volumen original con PBS +0,1% NP40.
4. Centrifugar de nuevo a 700 g durante 15 min y desechar el sobrenadante. Si es necesario, repetir hasta que el sedimento haya perdido la mayor parte de su color rojo.
5. Añadir 2-3 gotas de solución de lisis. Desintegrar el sedimento dentro de esta solución utilizando un bastón estéril no empapable (p. ej., un asa de inoculación bacteriana plástica desechable) o un bastoncillo de cristal siliconado limpio. La solución se pondrá viscosa. Hacerla lo más homogénea posible.
6. Añadir sucesivos volúmenes de 0,5 ml de la solución de lisis, mezclando cada vez, hasta que la viscosidad permita que la solución sea pipeteada arriba y abajo sin dificultad. El volumen final dependerá del tamaño, la naturaleza y la calidad de la muestra sanguínea. Para 10 ml de sangre normal congelada en fresco, utilizar 2-3 ml de solución de lisis.
7. Añadir 1/10 volumen de SDS al 20%. Mezclar suavemente con una pipeta de transferencia e incubar a 37 °C durante un mínimo de 15 min. Las muestras pueden dejarse toda la noche en este estadio.
8. Transferir la muestra a un tubo de polipropileno tapado. Añadir un volumen equivalente de cloroformo/alcohol isoamilo y un volumen equivalente de fenol. Mezclar suavemente mediante inversión durante 5 min. Centrifugar a 1.300 g durante 15 min.

9. Transferir la fase acuosa superior a un nuevo tubo de polipropileno. Dejar aparte la interfase proteica blanca y la fase orgánica. Esto puede ser difícil si la solución es demasiado viscosa, en cuyo caso es necesaria una dilución ulterior con solución de lisis.
10. Repetir los pasos 8 y 9 al menos una vez más y continuar hasta que la interfase esté clara. Añadir un volumen equivalente de cloroformo/alcohol isoamilo y mezclar suavemente mediante inversión durante 5 min. Centrifugar como antes y de nuevo transferir la fase acuosa a un tubo universal o tapado de 10 ml.
11. Añadir 2,5 volúmenes de etanol puro. Mezclar la solución invirtiendo el tubo varias veces. El ADN debe precipitar como una bolita de algodón blanco. Utilizando la punta de una micropipeta, transferir el ADN a un tubo de microcentrífuga que contenga 1 ml de etanol al 70%.
12. Centrifugar en una microcentrífuga a 12.000 g durante 5 min. Desechar el etanol residual y eliminar todo el remanente con una micropipeta.
13 Dejar secar en la mesa durante 10 min.
14. Añadir 50-500 µl de TE dependiendo del volumen del sedimento. Intentar alcanzar una concentración de ADN de aproximadamente 0,5 mg/ml. Dejar para resuspender durante al menos una noche. Mezclar suavemente moviendo de arriba abajo, nunca en círculos. El ADN puede almacenarse durante períodos largos a 4 °C o congelarse a –20 °C.

Extracción de ADN de otras fuentes

Para el análisis de reordenamientos de genes de Ig y TCR, es necesario enriquecer una muestra de sangre periférica con linfocitos antes de realizar la extracción de ADN. Esto se consigue mediante la separación de células mononucleares sobre Ficoll/Hypaque (o Lymphoprep). Después de lavar el sedimento celular en PBS, la lisis y extracción del ADN puede realizarse como se describe a partir del paso 5.

El ADN se extrae a partir de aspirados de médula ósea de la misma forma que a partir de sangre periférica, excepto que antes de congelar se diluyen en al menos 5 volúmenes de PBS.

Las biopsias tisulares varían en gran medida en naturaleza, tamaño y contenido celular y, como consecuencia, también lo hace la calidad y la cantidad del ADN obtenido de ellas. Para obtener cantidades suficientes de ADN de alto peso molecular para el análisis por la técnica de Southern, la biopsia debe tener varios milímetros cúbicos de tamaño y congelarse en fresco. Si se dispone de una biopsia de estas características, se pueden obtener suficientes células mediante la disrupción mecánica que se produce introduciendo la muestra primero en PBS y cortándola con una cuchilla limpia en capas finas y a continuación rompiéndola con el extremo romo del émbolo de una jeringuilla de 5 ml. La suspensión se centrifuga para obtener un sedimento, a partir del cual el ADN se extrae como antes (a partir del paso 5). Para biopsias más pequeñas, es mejor tratar la muestra con proteinasa K previamente a la extracción, como sigue:

1. Colocar el tejido en 700 µl de Tris-HCl 50 mmol/l, pH 8,0, NaCl 100 mmol/l, 1% (p/v) SDS que contenga 100 µg/ml de proteinasa K.
2. Cortar el tejido con unas tijeras finas e incubar a 50 °C durante toda una noche.
3. Realizar la extracción y la precipitación del ADN con fenol/cloroformo como a partir del paso 8 anteriormente descrito.

Determinación de la concentración de ADN

Tomar 5 µl de la solución de ADN y diluir en 245 µl de agua. Mezclar bien agitando en círculos. (Este ADN será descartado y, por consiguiente, puede tratarse de esta forma.) Leer la absorbancia (A) en un espectrómetro a 260 nm contra un testigo de agua. Una A de 1,0 se obtiene a partir de una solución de ADN a una concentración de 50 µg/ml. Por tanto, multiplicar la A leída por 2.500 para alcanzar la concentración de la solución de ADN original en µg/ml. La relación de la A_{260} con respecto a la A_{280} ofrece una idea de la pureza de la solución de ADN. Esta relación debe estar en el intervalo 1,7-2,0.

Apéndice B. Reacción en cadena de la polimerasa

Reactivos

Taq polimerasa y cebadores de oligonucleótidos. Éstos pueden adquirirse en muchas compañías diferentes. Los oligos suelen tener unas 18-22 bases.

Tampones para la PCR. Suelen suministrarse junto con la Taq polimerasa. Se pueden preparar tres tampones diferentes como sigue:

- *Tampón I PCR x10*. 100 mmol/l Tris-HCl, pH 8,3, 500 mmol/l KCl, 15 mmol/l $MgCl_2$, 0,1% (p/v) gelatina, 0,5% (v/v) NP40, y 0,5% (v/v) Tween 20.
- *Tampón II PCR x10*. 670 mmol/l Tris, pH 8,8, 166 mmol/l $(NH_4)_2SO_4$, 25 mmol/l $MgCl_2$, 670 µmol/l Na_2 EDTA, 1,6 mg/ml albúmina de suero bovino (ASB), y 100 mmol/l β-mercaptoetanol. Este tampón es utilizado junto con dimetilsulfóxido 10% (DMSO) en la mezcla de reacción final.
- *Tampón III PCR x10*. 750 mmol/l Tris, pH 8,8, 200 mmol/l $(NH_4)_2SO_4$, 0,1% (v/v) Tween 20. Se prepara también una solución de 25 mmol/l $MgCl_2$ y se añade de forma separada a la reacción de PCR.

dNTP, 10 mmol/l. Tomar 10 µl de 100 mmol/l dATP, 10 µl de 100 mmol/l dTTP, 10 µl de 100 mmol/l dCTP, 10 µl de 100 mmol/l dGTP y 60 µl de agua para obtener 100 µl de 10 mmol/l dNTP.

DMSO.

Agarosa, medio de electroendósmosis tipo II.

×*10 Tampón Tris-borato-EDTA (TBE)*. Añadir 216 g de base de Trizma, 18,6 g de EDTA y 110 g de ácido ortobórico a 1.600 ml de agua. Disolver y rellenar hasta 21; diluir 1 en 20 partes para utilizar como tampón ×0,5 TBE.

Bromuro de etidio, 10 mg/ml. Disolver 1 g de bromuro de etidio en 100 ml de agua, y guardar en una botella marrón o envuelta en papel de aluminio. **Atención: está comprobado que el bromuro de etidio es un teratógeno. Llevar máscara facial y manejar con guantes dobles.**

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tinción de rastreo. Pesar 15 g de Ficoll (tipo 400), 0,25 g de azul de bromofenol y 0,25 g de cianol xileno. Rellenar hasta 100 ml con agua, tapar y mezclar mediante inversión; requerirá una considerable tiempo de mezcla para hacer que la solución sea homogénea. Repartir en alícuotas.

Método

Las condiciones óptimas para la reacción tienen que establecerse de forma empírica, siendo la concentración de magnesio y la temperatura de hibridación los parámetros más importantes[48]. La selección del tampón depende de la enzima utilizada, y el fabricante habitualmente proporcionará la más apropiada. Para genes con un alto contenido en GC, el tampón II (explicado previamente) en combinación con DMSO al 10% puede dar lugar a una mejor amplificación. En la mayoría de los casos, un volumen de reacción de 25 µl suele bastar, aunque se deben emplear 50 µl si es necesario evaluar si la amplificación ha sido útil antes de emprender cualquier manipulación ulterior. Debe incluirse siempre un testigo en blanco (esto es, una reacción sin molde) para controlar una posible contaminación. Si el testigo en blanco genera producto, el análisis queda invalidado. Puede también incluirse una muestra de ADN que se sepa que se ha amplificado; esta muestra se utilizará entonces como un control normal o positivo.

El riesgo de contaminación no puede sobreenfatizarse. Puede minimizarse mediante la utilización de puntas taponadas y teniendo micropipetas y áreas dedicadas a cada paso del análisis. Las condiciones de ciclado óptimas necesitan ser determinadas para cada termociclador. La especificidad se suele mejorar mediante una PCR de «inicio caliente». Ésta se consigue realizando todas las pruebas de PCR en hielo seco y transfiriendo los tubos al termociclador una vez que alcanza los 95 °C o utilizando una enzima que sólo se activa cuando la temperatura alcanza y se mantiene en los 95 °C durante varios minutos. En la preparación de un grupo de reacciones, los errores de pipeteado pueden minimizarse preparando una solución de premezcla que pueda distribuirse en los tubos de la microcentrífuga que contengan el molde de ADN. Cuando una PCR concreta va a ser realizada de forma repetitiva durante un período de tiempo, resulta útil preparar un mayor volumen (p. ej., 10 ml) de la reacción de mezcla (sin ADN o Taq polimerasa), hacer partes alícuotas y almacenar a –20 °C.

1. Preparar una mezcla de PCR para 10 reacciones (con un volumen final de 50 µl para cada muestra de ADN) como sigue:

Solución madre	*Vol (ml)*	*Concentración final*
Tampón PCR ×10	50	×1
dNTP 10 mmol/l	5	0,2 mmol/l
Cebador (1) 10 µmol/l	10	0,2 µmol/l
Cebador (2) 10 µmol/l	10	0,2 µmol/l
Taq polimerasa 5 u/ml	2	0,02 u/ml
Agua	—	410
Volumen final	—	490

Añadir la Taq polimerasa al final, mezclar bien y girar en pulsos en una microcentrífuga para sedimentar los contenidos del tubo.

Nota. Para algunas reacciones PCR y cuando se utiliza tampón tipo III de PCR como se explicó previamente, deben añadirse volúmenes adecuados de 25 mmol/l $MgCl_2$; la concentración final correcta, habitualmente entre 1,5 mmol/l y 3,0 mmol/l, debe determinarse empíricamente para cada par cebador. Ajustar el volumen de agua para compensar esto.

2. Poner 1 µl de molde de ADN en aproximadamente 0,5 mg/ml en cada uno de los nueve tubos de microcentrífuga de 0,5 ml y 1 µl de agua bidestilada en el décimo tubo. Hacer partes alícuotas de 49 µl de la mezcla preparada como se explicó previamente en cada tubo.
3. Recubrir la mezcla con 50 µl de aceite de parafina ligero y colocar los tubos en una máquina de PCR, programada con las siguientes características: un paso inicial de 5 min a 94 °C y a continuación 30 ciclos a 58 °C durante 1 min, 72 °C durante 1 min y 94 °C durante 1 min en forma de secuencia, seguida por un paso final de extensión a 72 °C durante 10 min. Estas condiciones son adecuadas para muchos pares de cebadores, aunque algunos requerirán diferentes temperaturas de hibridación o tiempos de extensión más prolongados.
4. Mientras el programa de PCR está corriendo, se prepara un minigel de agarosa al 1,5%: añadir 0,75 g de agarosa a 50 ml de ×0,5 tampón TBE y calentar hasta que se disuelva completamente. Añadir 2 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml), permitir que la agarosa se enfríe ligeramente y verter con el peine adecuado en posición.
5. Para evaluar si la amplificación ha sido útil, añadir 1 µl de tinción de rastreo a una alícuota de 10 µl de la mezcla de reacción PCR, teniendo cuidado de no pipetear el aceite mineral que recubre la reacción de PCR.
6. Cargar el gen y correr a un voltaje constante de 100 V durante 1 h en tampón TBE ×0,5. Debe incluirse un marcador del tamaño molecular para establecer el tamaño del fragmento amplificado; estos marcadores se han comercializado. El marcador utilizado en este capítulo es el plásmido pEMBL 8 digerido con Taq I y Pvu II para generar fragmentos de 1.443, 1.008, 613, 357, 278, 193 y 108 pb.
7. Visualizar el ADN en un transiluminador de luz ultravioleta (UV) y, si se requiere, hacer una fotografía.

Modificaciones y desarrollos

El procedimiento descrito previamente es una guía para realizar y evaluar una amplificación PCR estándar. De acuerdo con las necesidades, pueden introducirse modificaciones, como las siguientes:

Radiomarcado. Una PCR puede ser marcada con ^{32}P añadiendo 0,1 µl de [α^{32}P]dCTP por tubo a la mezcla de reacción.

Multiplex. Se puede amplificar más de un fragmento en el mismo tubo simplemente añadiendo nuevos pares de

cebadores. Es importante que los diferentes pares trabajen todos igualmente bien bajo condiciones idénticas.

PCR anidada. Ésta implica sucesivas rondas de amplificación utilizando dos pares de cebadores; el segundo par, localizado dentro de la secuencia amplificada por el primero, permite que los productos sean generados a partir de incluso una única célula.

Amplificación de intervalo extenso. Fragmentos de hasta 10 kb pueden ser generados mediante PCR utilizando polimerasas modificadas.

Automatización. La amplificación PCR de alto rendimiento se ha conseguido gracias al uso de robots y tecnología de platos con 96 pocillos.

Análisis automatizado de fragmentos. El método de electroforesis en gel se modifica para la detección de productos de PCR marcados con fluorescencia sobre analizadores de fragmentos de ADN (p. ej., el analizador de ADN ABI 3700).

Apéndice C. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Equipamiento y reactivos

Un tanque vertical para electroforesis en gel con placas, peines y espaciadores adecuados.
Una mesa de secado de gel con bomba de vacío.
Solución de acrilamida (p/v) al 40%.
Atención: la acrilamida es una potente neurotoxina.
Solución de bis-acrilamida al 2% (p/v).
Glicerol.
Urea (ultrapura).
Persulfato de amonio (p/v) al 10%.
TEMED.
Tampón TBE ×10 (v. apéndice B).
Tinción con formamida. A 10 ml de formamida desionizada, añadir 10 mg de cianol xileno FF, 10 mg de azul de bromofenol y 200 µl de EDTA 0,5 mol/l.

Método

El siguiente procedimiento describe la preparación de un gel largo, delgado (34 cm × 40 cm × 0,4 mm) de poliacrilamida desnaturalizante al 6%.

1. Limpiar las placas de cristal cuidadosamente con detergente y una esponjilla. Enjuagar bien y secar. Lavar la placa más larga con etanol al 100%. Tratar una superficie de la placa más pequeña con una solución siliconizante o una solución de gel algodonoso no tóxico (p. ej., Gel Slick de FMC) aplicando unos pocos mililitros y secando con una toallita de papel. Montar el gel utilizando espaciadores, abrazaderas y cinta aislante alrededor del fondo del gel. Asegurar que las juntas están contiguas a la placa más pequeña.
2. Mezclar 12 ml de acrilamida al 40%, 12 ml de bis-acrilamida al 2%, 8 ml de TBE ×10 y 36,8 g de urea y ajustar el volumen a 80 ml con agua bidestilada. Añadir 500 µl de persulfato de amonio al 10% y 50 µl de TEMED; mezclar y verter la solución lentamente entre las placas de cristal utilizando una jeringa de 50 ml. Cuando estén llenos, insertar un peine invertido (superficie lisa hacia abajo) no más de 6 mm dentro del gel. Dejar polimerizar.
3. Eliminar la cinta eléctrica y las abrazaderas y colocar el gel en el tanque de electroforesis. Llenar las cámaras superior e inferior con TBE ×1. Retirar el peine, y purgar la superficie del gel con tampón TBE utilizando una jeringa y una aguja curvada. Limpiar e invertir el peine e insertarlo entre las placas hasta que los dientes contacten mínimamente con la superficie del gel.
4. Mezclar 1-4 µl de producto PCR radiomarcado con 6 µl de tinción de formamida. Calentar a 95 °C durante 5 min. Poner a enfriar en hielo húmedo. Purgar cada pocillo utilizando tampón TBE y cargar 5 µl de cada muestra entre los dientes. Correr el gel a 40-60 V hasta que se haya obtenido una resolución adecuada. (Como guía, el azul de bromofenol y el cianol xileno comigrarán con los fragmentos de 25 y 105 pb de ADN, respectivamente, en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 6%.)
5. Desconectar el suministro eléctrico, retirar las placas y colocarlas en una superficie plana. Sacar uno de los espaciadores de entre las placas. Insertar una espátula de metal o una fina cuña de plástico en el espacio entre las placas al fondo de la esquina donde se encontraba el espaciador. Levantar la placa más pequeña siliconada del gel. Cortar una pieza de papel de Whatman 3 MM de forma que sea ligeramente más larga que el área del gel y colocarla sobre el gel. Dar la vuelta a la placa más pequeña sobre el papel Whatman, aplicar una ligera presión e invertir las placas. Con cuidado, levantar la placa más larga, asegurándose de que el gel se pega al papel de Whatman. Cubrir el gel con película adherente y recortar todos los bordes.
6. Secar el gel en vacío a 80 °C durante aproximadamente 1 h. Despegar la película adherente y exponer el gel a la película de rayos X durante la noche a –80 °C para obtener una autorradiografía.

Para el análisis de SSCP, se utiliza un gel no desnaturalizante. El procedimiento es el mismo que se describió con anterioridad, pero la composición del gel es diferente. La siguiente mezcla de gel puede utilizarse para obtener un gel extenso corrido durante la noche a 8-12 mA en un laboratorio frío (20-22 °C): 12 ml de acrilamida al 40%, 2,4 ml de bis-acrilamida al 2%, 4 ml de glicerol, 8 ml de de ×10 TBE y 53,6 ml de agua. Es frecuente que se introduzcan cambios para incrementar la posibilidad de observar movilidad aberrante (o cambios) en las cadenas de ADN mutantes. Éstos incluyen alterar el contenido del gel por ejemplo en el % de glicerol y en el % de acrilamida y en la relación acrilamida:bis-acrilamida aplicada, así como aplicar variaciones en la temperatura y velocidad de la electroforesis.

Como alternativa a la utilización de reacciones PCR marcadas con ^{32}P, es posible visualizar los productos de ADN en estos geles de poliacrilamida mediante tinción con plata utilizando el método que se describe a continuación.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tinción con plata de ADN en geles de poliacrilamida (cortesía del Dr. P. Goncalves)

1. Desmontar el gel y fijarlo empapándolo en 100 ml de ácido acético al 10% durante 20 min a temperatura ambiente, preferiblemente en una plataforma con agitación constante.
2. Sacar el ácido acético y conservarlo aparte. Lavar el gel con agua, ×3 durante 2 min.
3. Incubar durante 30 min a temperatura ambiente con un reactivo de nitrato de plata compuesto de 0,1 g de nitrato de plata, 150 µl de formaldehído al 37% (v/v), y agua hasta alcanzar un volumen final de 100 ml.
4. Retirar el reactivo de plata y lavar durante 30 s con agua.
5. Añadir 100 ml de un reactivo de carbonato sódico: preparar 200 ml 3% (p/v) Na_2CO_3 y justo antes de utilizar añadir 300 µl de formaldehído al 37% (v/v) y 40 µl de tiosulfato sódico 10 mg/ml. Incubar con agitación hasta que las bandas empiezan a aparecer.
6. Retirar el reactivo de carbonato y añadir los restantes 100 ml de solución de carbonato sódico. Cuando las bandas son claramente visibles, retirar esta solución y parar la reacción añadiendo nuevamente los 100 ml de ácido acético al 10% que se obtuvieron en el paso 2.

Apéndice D. Digestión con enzimas de restricción de productos de reacción en cadena de la polimerasa

Reactivos

Varias compañías proporcionan en la actualidad un listado bastante completo de enzimas de restricción (ER), pero su coste puede variar mucho entre unas y otras. Aquellas que se suelen utilizar son, por lo general, bastante económicas comparado con las enzimas más especializadas que sólo se utilizan ocasionalmente y que pueden ser entre diez y cien veces más caras. Los tampones adecuados casi siempre se suministran con cada ER. Las composiciones de los tampones casi siempre son conocidas y varían de enzima a enzima. Muchas ER utilizadas habitualmente escinden perfectamente bien en un tampón «universal» único. Éste se prepara utilizando las siguientes soluciones de depósito:

Tris-acetato, 2 mol/l, pH 7,5. Disolver 24,2 g de base de Trizma en 60 ml de agua, ajustar el pH a 7,5 con ácido acético glacial y rellenar hasta 100 ml.

Acetato potásico, 2 mol/l. Pesar 19,62 g, rellenar hasta 100 ml con agua y disolver.

Acetato magnésico, 2 mol/l. Pesar 42,89 g, rellenar hasta 100 ml con agua y disolver.

ASB fracción V (grado biología molecular). 20 mg/ml.

Ditiotreitol (DTT), 0,5 mol/l. Pesar 0,771 g, rellenar hasta 10 ml con agua, disolver y almacenar a –20 °C.

Espermidina (N-(3-aminopropilo)-1, 4-butano-diamina), 1 mol/l. Pesar 1,273 g, rellenar hasta 10 ml con agua, disolver y almacenar a –20 °C.

Tampón ER x10. Para un tampón concentrado ×10, preparar una solución de Tris-acetato 300 mmol/l, pH 7,5, acetato potásico 660 mmol/l, acetato magnésico 100 mmol/l, BSA 1 mg/ml, DTT 10 mmol/l y espermidina 30 mmol/l; hacer partes alícuotas en tubos de microcentrífuga y almacenar a –20 °C.

Método

1. Transferir 30 µl del producto amplificado a otro tubo de microcentrífuga, teniendo cuidado de no transferir nada del aceite mineral. Añadir 4 µl de tampón para enzima de restricción ×10, 4,5 µl de agua bidestilada y 2-5 unidades de enzimas de restricción adecuadas (habitualmente 0,5 µl), constituyendo un volumen final de 40 µl.
2. Incubar a 37 °C (u otra temperatura que especifique el fabricante) durante un mínimo de 4 h. Cuando se prepara más de una digestión con la misma enzima de restricción, pueden mezclarse y distribuirse previamente suficiente tampón, enzimas y agua en los tubos de microcentrífuga antes de añadir 30 ml del producto de PCR.
3. Verter un minigel al 3,0% de agarosa en una cubeta con el peine adecuado. El gel está constituido a partir de una mezcla 1:1 de agarosa de electroendósmosis medio tipo II y agarosa Nusieve (de FMC Bioproducts), esto es, 0,75 g de agarosa y 0,75 g de agarosa Nusieve en 50 ml de tampón TBE de potencia media (×0,5) (v. apéndice B).
4. Después del período de incubación, añadir 3 µl de tinción de rastreo a los productos de la digestión y cargar las muestras sobre el gel. La electroforesis se lleva a cabo hasta que se alcanza una clara separación de todos los fragmentos esperados, lo que puede evaluarse a intervalos colocando el gel en un transiluminador UV.

Apéndice E. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

Reactivos

Tampón de lisis de eritrocitos concentrado x10 (RCLB). Para 3 l, pesar 248,7 g de NH_4Cl (1,55 mol/l), 30,03 g de $KHCO_3$ (0,1 mol/l). Añadir 6 ml de 0,5 mol/l EDTA (0,1 mmol/l), pH 7,4, y rellenar hasta los 3 l con agua estéril y almacenar a 4 °C.

RCLB. Rellenar 500 ml de ×10 RCLB hasta 5 l con agua estéril y enfriar a 4 °C. Ajustar la solución de trabajo a pH 7,4 con HCl, y almacenar a 4 °C.

Citrato 1 mol/l, pH 7,0. Neutralizar 1 mol/l de citrato trisódico con ácido cítrico 1 mol/l.

Acetato sódico. 3 mol/l de acetato sódico se ajusta a un pH de 5,2 con ácido acético glacial.

Tiocianato de guanidina (GTC). Dado que el GTC es altamente tóxico, es recomendable utilizar la cantidad total como la entrega el fabricante, en vez de pesar una cantidad precisa. Por tanto, con 1 kg de GTC añadir 21,15 ml de EDTA 0,5 mol/l (5,0 mmol/l), pH 8,0, 52,87 ml de 1 mol/l citrato, pH 7,0, 35,25 ml de 30% sarcosil (0,5%) y rellenar 2,115 l con agua estéril. Almacenar esta solu-

ción en partes alícuotas de 50 ml. Añadir 7,1 µl de β-mercaptoetanol por mililitro de GTC inmediatamente antes de su utilización.

Soluciones para la mezcla de ADN complementario

Cebadores hexaméricos aleatorios 5 mg/ml. Reconstituir 50 U pdN_6 (Pharmacia) con 539 µl de agua estéril y añadir 21 µl de 0,5 mol/l KCl.

Tampón 5′ RT (habitualmente suministrado) con transcriptasa inversa (TI) M-MLV. 0,25 mol/l Tris-HCl, pH 8,3, 0,375 mmol/l KCl, 15 mmol/l $MgCl_2$.

25 mM dNTP madre. Mezclar un volumen equivalente de 100 mmol/l dATP, dCTP, dGTP y dTTP 0,1 M ditiotreitol (DTT), que suele suministrarse junto con M-MLV TI.

Mezcla ADNc. A 428 µl de 5′ tampón RT, añadir 21,5 µl de DTT, 85,5 µl de 25 mmol/l dNTP y 45 µl de hexámeros aleatorios a concentración de 5 mg/ml; rellenar hasta 1.000 µl con agua estéril.

La composición de las mezclas de PCR Multiplex y anidadas se presenta en la tabla 21.4, incluyendo la concentración óptima de $MgCl_2$ para cada mezcla así como los cebadores utilizados en las diferentes reacciones de PCR.

Métodos

Preparación del lisado nuclear

1. Para evaluar la EMR en la LMC pueden analizarse tanto la sangre como el aspirado de médula ósea aunque en los estudios de EMR por LLA se prefieren los aspirados de médula ósea. Centrifugar la muestra de sangre periférica anticoagulada a 700 g durante 15 min. Los aspirados de médula ósea pueden ser tratados de la misma forma que las capas leucocitarias pasando directamente al paso 4.
2. Eliminar cuidadosamente el plasma, con cuidado de no alterar la capa leucocitaria.
3. Utilizar una pipeta Pasteur de plástico estéril, recoger la capa leucocitaria y transferirla a un tubo de polipropileno 50 ml. No es necesario recoger toda la capa leucocitaria si el recuento de leucocitos es mayor de 50×10^9/l.
4. Lisar los eritrocitos contaminantes, resuspender la capa leucocitaria en RCLB con hielo frío hasta un volumen final de 50 ml, y agitar en vórtice durante unos segundos. Después la suspensión se incuba en hielo húmedo durante 10 min, invirtiendo el tubo de vez en cuando.

Tabla 21.4. Composición de mezclas de PCR utilizadas en la amplificación de BCR–ABL para crear sitios de reconocimiento de la enzima de restricción

	PCR Multiplex	PCR Anidada			
		p210		p190	
		1.er paso	2.º paso	1.er paso	2.º paso
Tampón PCR (x10)	1,2×	1,25×	1,0×	1,25×	1,0×
$MgCl_2$ (mmol/l)	1,8	3,125	1,75	2,25	1,75
dNTP (µmol/l)	240	250	200	250	200
Cebador 1 (µmol/l)	C5e– (0,6)	NB1 + (0,625)	CA3– (0,5)	BCR 1+ (0,625)	CA3– (0,5)
Cebador 2 (µmol/l)	CA3– (0,6)	Abl3– (0,625)	B2A (0,5)	Ab13– (0,625)	E1N+ (0,5)
Cebador 3 (µmol/l)	B2B (0,6)				
Cebador 4 (µmol/l)	BCR-C (0,6)				
Las secuencias de los cebadores son como siguen:					
BCR1+: 5′ GAACTCGCAACAGTCCTTCGAC 3′					
BCR-C: 5′ ACCGCATGTTCCGGGACAAAAG 3′					
C5e–: 5′ ataggaTCCTTTGCAACCGGGTCTGAA 3′[a]					
NB1+: 5′ GAGCGTGCAGAGTGGAGGGAGAACA 3′					
Ab13–: 5′ GGTACCAGGAGTGTTTCTCCAGACTG 3′					
B2A: 5′ TTCAGAAGCTTCTCCCTGACAT 3′					
CA3–: 5′ TGTTGACTGGCGTGATGTAGTTGCTTGG 3′					
E1N+: 5′ AGATCTGGCCCAACGATGACGA 3′					

[a] Las letras en minúscula representan los cambios introducidos para crear el sitio de corte para la enzima de restricción.
PCR, reacción en cadena de la polimerasa.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

5. Centrifugar de nuevo a 700 g durante 10 min y descartar el sobrenadante invirtiendo el tubo, cuidando de no perder el sedimento nuclear.
6. Repetir los pasos 4 y 5 hasta que el sedimento nuclear pierde el color rojo-sonrosado. Habitualmente son suficientes dos lavados con RCLB.
7. Lavar el sedimento nuclear una vez con 20-30 ml de PBS centrifugando a 700 g durante 10 min.
8. Resuspender el sedimento nuclear en 1-2 ml de GTC que contenga β-mercaptoetanol. Homogeneizar la suspensión pasándola a través de una jeringa de 2 ml y una aguja de 21 G repetidas veces hasta que pierda su viscosidad (p. ej., el ADN es degradado). En algunos casos puede ser necesario añadir más GTC.
9. El lisado puede a continuación almacenarse a –20 °C o –70 °C durante varios años.

Extracción del ARN

Hay varios protocolos, incluyendo equipos comercializados, que permiten obtener ARN de calidad variable. El protocolo descrito a continuación, originalmente descrito por Chomczynski y Sacchi[49], puede aplicarse fácilmente en un laboratorio clínico.

1. Añadir 50 µl de NaOAc 2 M, pH 4,0 a 500 µl de lisado de GTC en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y agitar en vórtice brevemente.
2. Añadir 500 µl de agua no neutralizada saturada con fenol y 100 µl de cloroformo. Agitar la mezcla durante 10 s y transferir a hielo húmedo durante 20 min.
3. Centrifugar a 12.000 g durante 30 min a 4 °C.
4. Después de la centrifugación, deben ser claramente discernibles dos capas distintas; si no es así, añadir otros 50 ml de cloroformo. Agitar en vórtice durante 10 s y centrifugar de nuevo durante 30 min a 4 °C. Transferir la capa acuosa superior a otro tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, teniendo cuidado de no alterar la interfase.
5. Añadir un volumen equivalente de propan-2-ol (isopropanol), tapar el tubo, mezclar mediante inversión e incubar a –20 °C durante 2 h o toda la noche.
6. Microcentrifugar durante 30 min a 4 °C y descartar el sobrenadante, con cuidado para no perder el sedimento, que puede ser difícil de ver.
7. Lavar el sedimento en 1 ml de 80% etanol. No mezclar. Centrifugar directamente durante 30 min a 4 °C, y descartar el sobrenadante. Volver a centrifugar brevemente para recoger el etanol residual y desecharlo utilizando una micropipeta.
8. Secar al aire el sedimento durante 10 min y reconstituir en 20-40 µl de agua estéril. El ARN debe ser almacenado a –70 °C. Sin embargo, la opción preferible es la transcripción inversa inmediata.

Síntesis de ADNc

1. Incubar 19 µl de ARN en un tubo de microcentrífuga 1, 5 ml (aproximadamente 20 µg) a 65 °C durante 10 min. Esto se hace para desnaturalizar el ARN, que rápidamente forma estructuras secundarias reduciendo la eficiencia de la transcriptasa inversa. Centrifugar a 12.000 g brevemente para recoger la condensación en el fondo del tubo. Transferir al tubo con hielo húmedo.
2. En el hielo húmedo, añadir 21 µl de mezcla de ADNc que contenga 300 U M-MLV RT y 30 U de RNasina.
3. Incubar la mezcla a 37 °C durante 2 h. Cuando se utilizan cebadores específicos de gen en esta reacción, la temperatura debería aumentarse a 42 °C.
4. Terminar la reacción incubando la mezcla a 65 °C durante 10 min. El ADNc puede almacenarse a –20 °C.

PCR Multiplex

Añadir 2 µl de ADNc a 20 µl de mezcla de PCR Multiplex (v. tabla 21.4); añadir 0,5 U de Taq polimerasa. Recubrir con 1 gota de aceite mineral y amplificar aplicando las condiciones descritas en el apéndice B. Llevar a cabo la electroforesis sobre los productos de la PCR a través de un gel de agarosa al 2,0% que contenga bromuro de etidio.

PCR anidada

1. Añadir 5 µl de ADNc a 20 µl de mezcla del primer paso de PCR (v. tabla 21.4) y añadir Taq polimerasa 0,75 U. Recubrir con aceite mineral y amplificar. Las condiciones de ciclado de la PCR aplicadas son las del apéndice B excepto en que la temperatura de hibridación debe mantenerse a 68 °C durante 25 s.
2. Transferir 1 µl de productos de la PCR del primer paso a 19 µl de la mezcla de PCR del segundo paso (v. tabla 21.4). Recubrir con 1 gota de aceite mineral y amplificar utilizando una temperatura de hibridación de 64 °C durante 50 s. A continuación, realizar la electroforesis de los productos de PCR a través de un gel de agarosa al 2,0% que contenga bromuro de etidio. El procedimiento de PCR anidada es el mismo que se describe en p210 (b3a2 y b2a2) y p190 (e1a2).

Apéndice F. PCR cuantitativa en tiempo real

Reactivos

Mezcla maestra universal ×2. La mezcla maestra universal ×2 contiene dATP, dCTP, dGTP y dTTP cada uno en concentraciones de 200 µmol/l, 5,5 mmol/l $MgCl_2$ y 0,025 µmol/l AmpliTaq-Gold. También contiene la tinción de referencia pasiva, ROX. La mezcla maestra universal puede ser adquirida con o sin uracilo ADN glucosilasa, que degrada cualquier producto de PCR contaminante previamente al inicio de la PCR, mediante el calentamiento de la placa a 95 °C durante 10 min (v. más adelante). Es posible constituir mezclas maestras adquiriendo los diversos componentes, como dNTP, tampón, $MgCl_2$ y *Taq* ADN polimerasa de inicio en caliente. Sin embargo, la preparación doméstica de mezclas maestras no se recomienda para minimizar la variación intraensayo e interensayo y la contaminación, aspectos esenciales para monitorizar la respuesta de los pacientes a la terapia.

Mezcla sonda-cebador. Por comodidad y para minimizar la variación interensayo se recomienda preparar una mezcla de ensayo para PCR-QR en gran cantidad, que contenga las sondas y los cebadores a las concentraciones requeridas, a excepción de la mezcla maestra. La mezcla es almacenada a –20 o –70 °C. Esto también evita repetir la congelación y la descongelación de sondas y cebadores ya que esto puede afectar a la integridad sonda-cebador. Además, la sonda no debe dejarse expuesta directamente a la luz solar durante períodos prolongados porque esto conduce a su degradación. En general, 300 nmol/l de cada cebador y 200 nmol/l de sonda permiten alcanzar una sensibilidad óptima en la PCR-QR; sin embargo, este punto debe determinarse para cada ensayo titulando un cebador contra el otro. La concentración óptima de los cebadores es la que da la Ct más baja. De forma análoga, la concentración óptima de sonda se determina variando la cantidad de la misma. La cantidad que arroje la Ct más baja es la concentración de sonda óptima. La mezcla sonda-cebador se prepara después utilizando las concentraciones óptimas determinadas. La mezcla puede a continuación separarse en partes alícuotas en tubos de microcentrífuga según el número requerido de muestras, permitiendo incluir controles positivos y negativos. Además, para los estudios de EMR es recomendable medir el gen diana en replicados de tres para minimizar el error muestral en valores con bajo número de copias. Debido a que el número de copias del gen control endógeno es conocido, bastarán los ensayos en duplicado. Sin embargo, los estándares para el control endógeno deben realizarse por triplicado.

Diseño de sonda y cebadores. La sonda y los cebadores son diseñados utilizando Primer Express Software (Applied Biosystems, Foster City, CA). El diseño óptimo de las sondas y cebadores es crítico para obtener una buena sensibilidad con la PCR-QR. La sonda se diseña de forma que tiene mayor T_m que los cebadores y trabaja de forma óptima los ajustes de PCR para la mezcla maestra universal. La sonda debe carecer de una base guanina en el extremo 3′, y el número de bases de guanina debe ser menor que el de bases citosina. Además, no debe haber más de 4 bases guanina colocadas en tándem. Las mismas reglas se aplican al diseño de los cebadores. La temperatura de hibridación de la sonda debe ser 10 °C mayor que la de los cebadores. Es esencial diseñar sondas y cebadores tales que el ensayo sea específico para el ARN. Esto se consigue posicionando los cebadores directo e inverso en exones separados o colocando ya los cebadores o la sonda a lo largo de un sitio de corte.

Curva estándar. Es aceptable comunicar los resultados como Ct, siendo un incremento de 3,3 clínicamente significativo, dado que esto representa un incremento de 1 log en las copias *BCR-ABL*; cada incremento logarítmico en los amplicones requiere 3,3 ciclos. En muestras clínicas, sin embargo, es esencial generar una curva estándar a partir de la cual puedan calcularse los valores desconocidos. La curva estándar puede ser generada utilizando ADNc diluido en serie y derivado de una línea celular que exprese el gen diana a niveles altos (p. ej., K562 para *BCR-ABL*). Como alternativa al uso de ADNc, se puede utilizar un plásmido para crear esta curva, lo que proporciona estabilidad a lo largo del tiempo. El método de preparación del plásmido está más allá del alcance de este libro. Se han comercializado plásmidos diluidos en serie para genes de fusión que aparecen con frecuencia y genes endógenos de control. En ausencia de una curva estándar los valores de EMR son comunicados como un Ct delta-delta (ΔCt). Este valor se calcula normalizando primero el gen de fusión Ct (CtFG) al gen control (CtCG) para obtener un ΔCt para las muestras de seguimiento: esto es, el ΔCt (seguimiento) = $Ct_{FG} - Ct_{CG}$. El mismo cálculo se realiza para el valor Ct de la muestra tomada en el diagnóstico para obtener un ΔCt (diagnóstico). El ΔCt (diagnóstico) se resta a continuación del ΔCt (seguimiento) para obtener un ΔΔCt. A partir de este el valor de EMR se calcula como $10^{\Delta\Delta Ct/3.3}$. Para aplicar el método de comunicación ΔΔCt, los valores gradiente y de corte para los genes control y de fusión han de ser similares. Para ser más precisos se recomienda que los valores pendiente para los genes fusión y control no difieran en más de 0,01 (esto es, la eficiencia de la PCR para CG y FG son similares). La principal ventaja de usar el ΔCt es que se obvia la necesidad de una curva estándar. Por consiguiente, eliminando la necesidad de una curva estándar basada en plásmido o ARN se reduce aún más el riesgo de contaminación y se dejan libres pocillos de la placa para muestras de pacientes.

Condiciones de ciclado de la PCR. Es conveniente diseñar las sondas y los cebadores de forma que sean capaces de trabajar eficientemente utilizando condiciones de PCR-QR para amplificar el ADNc, los cuales están 2 min a 50 °C (para permitir la eliminación mediada por glucosilasa ADN uracilo de la contaminación exógena del producto de PCR), un paso de activación enzimática por calor de 10 min de duración a 95 °C, seguida de 50 ciclos de 15 s a 95 °C para desnaturalizar y 1 min a 60 °C para la hibridación y la extensión.

Método

El ensayo de PCR-QR se lleva a cabo normalmente en placas de 96 pocillos en un volumen de reacción final de 25 µl que contenga mezcla maestra universal. La composición de una reacción PCR-Q con 25 µl se muestra en la tabla 21.5.

1. Repartir 20 µl de mezcla PCR-QR en el número requerido de pocillos de microtitulación. Para minimizar las diferencias intermuestras se recomienda una pipeta automática de 8 canales para repartir la mezcla PCR-Q del ensayo. Marcar la localización de cada muestra, incluyendo los estándares y controles, sobre una plantilla en la que cada uno de los 96 pocillos esté representado.
2. Utilizando la plantilla, añadir 5 µl del ADNc adecuado o del estándar a cada pocillo.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 21.5. Solución 25 μl ensayo PCR-Q

Solución madre	Concentración	Volumen (μl)	Volumen (μl, 110 reacciones)	Concentración de trabajo
Mezcla maestra universal	×2	12,5	1375	×1
Cebador directo	80 μmol/l	0,094	10,31	300 nmol/l
Cebador inverso	189 μmol/l	0,04	4,37	300 nmol/l
Sonda marcado-dual	20 μmol/l	0,125	13,75	100 nmol/l
ADN complementario	–	5,0	–	–
Agua estéril	–	7,24	796,6	–

PCR-Q, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa. Se indican los volúmenes para una preparación en gran cantidad de la mezcla sonda-cebador; son suficientes para 96 muestras (esto es, placas de 96 pocillos) y permiten pipetear. La mezcla maestra universal (Universal Master Mix) se añade justo antes de montar la PCR-Q.

3. En los pocillos controles sin molde se incluye ADN genómico en los estudios basados en ARNm. Añadir ADNc de línea celular HL60 a los pocillos controles de no amplificación en los ensayos PCR-QR para *BCR-ABL* debido a que esta línea celular no expresa este gen de fusión.
4. También se incluye ADNc derivado de líneas celulares K562 y BV173 diluidas para dar un número conocido de copias.
5. En la distribución de todas las muestras, asegurar los pocillos con tapones ópticos o una película adhesiva.
6. Centrifugar la placa durante 2-3 s a 1.000 rpm para recoger todo el contenido del fondo de los pocillos y expulsar cualquier burbuja atrapada previamente a su colocación en el instrumento.
7. Iniciar el ciclado según las instrucciones del fabricante, ajustando el volumen de la muestra y el número de ciclos de forma concordante. La placa es normalmente sometida a entre 40 y 50 ciclos.
8. Al finalizar, asignar los pocillos de microtitulación de acuerdo con la plantilla y analizar el ensayo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El instrumento sitúa el umbral en ×10 la desviación estándar de la emisión basal; sin embargo puede ponerse a cero manualmente dentro de la fase exponencial de la PCR para evitar cualquier interferencia fluorescente de fondo. De forma alternativa, el umbral puede situarse en el mismo valor en cada ensayo, por ejemplo, a 0,05, aceptando que se encuentra dentro de la fase exponencial de la PCR y evitando por tanto la variación entre técnicos distintos. Los datos para cualquier muestra con una Ct superior a 38 no se consideran fiables.

Los límites basales son establecidos de acuerdo con el instrumento; sin embargo, éste debe ajustarse de forma que el límite superior del basal sea 4 ciclos menor que el valor Ct más bajo para una muestra determinada. Por ejemplo, si el Ct más bajo es 20, entonces el límite basal superior se sitúa en 16, dando así un claro margen entre el valor basal y las muestras. El límite inferior establecido por el instrumento rara vez requiere que se ajuste.

La curva estándar es generada y aceptada si el valor del gradiente está entre –3,3 y –3,6. Un valor de gradiente de –3,3 representa una eficiencia de la PCR del 100% ya que conlleva 3,3 ciclos para cada incremento logarítmico en generar los productos PCR. Idealmente, la curva de coeficientes de correlación no debe ser menor de 0,98. Si la curva estándar es aceptable, entonces el número de copias para las muestras puede registrarse. La PCR-QR para el gen de control endógeno es llevada a cabo de forma similar utilizando las sondas y cebadores adecuados. Al finalizar la PCR-QR para el gen diana y para el control endógeno, los datos se comunican como razón de porcentajes (p. ej., *BCR–ABL*:*ABL* × 100).

Notas

Para minimizar el error de muestreo, el gen diana y los estándares son analizados por triplicado. Es esencial incluir controles positivos con un número conocido de tránscritos. Para minimizar el riesgo de contaminación de las muestras de pacientes y de estándares deben ser manejados en localizaciones geográficamente separadas. Ya que los ensayos de PCR-QR son tránscrito-específicos de *BCR–ABL*, es esencial realizar una PCR Multiplex en la muestra de presentación para asignar el tipo de tránscrito expresado por el paciente (v. apéndice E). Esto asegura que se utilice la PCR-QR adecuada. Un ensayo PCR-QR diseñado para b2a2 o b3a2, ahora denominados e13a2 y e14a2, respectivamente, daría datos falso negativos en pacientes que expresen e13a3 y/o e14a3. Una PCR-QR única para e13a2 y e14a2 es más recomendable que realizar dos ensayos separados para e13a2 y e14a2. Esto se consigue diseñando el ensayo de forma que la sonda y el cebador inverso mapeen el segundo exón (p. ej., a2) del gen *ABL* y el cebador directo mapee el exón e13 (p. ej., b2) del gen *BCR* (v. fig. 21.10). Aparte de ser más rentable y eficiente, incrementa la exactitud del ensayo, ya que una minoría significativa de pacientes con un polimorfismo de nucleótido único en el exón 13 del gen *BCR* tiene el potencial de expresar tanto e13a2 y e14a2.

GLOSARIO

ADN complementario (ADNc). Una molécula de ADN complementaria a una molécula de ARN, habitualmente sintetizada *in vitro* por la enzima transcriptasa inversa (TR).

ADN recombinante. Cualquier molécula de ADN construida artificialmente uniendo segmentos de ADN de diferentes orígenes.

Alelos. Formas alternativas de un gen en un locus concreto (p.ej., β^A, βS y β^{thal}). Pueden existir muchos alelos diferentes en una población pero dos como máximo en un individuo.

Cebadores. Oligonucleótidos utilizados para iniciar la síntesis de ADN *in vitro* mediante la enzima ADN polimerasa.

Clon genómico. Un clon molecular formado por una porción de ADN celular.

Clon, celular. La progenie de una única célula. Las células que pertenecen al mismo clon reciben el nombre de población celular monoclonal.

Clon, molecular. Un número extenso de moléculas de ADN idénticas, habitualmente obtenidas por la propagación de un único plásmido o molécula de bacteriófago en una bacteria.

Codón. Un triplete de nucleótidos que codifica para un aminoácido o para una señal de terminación.

Deleción. Mutación causada por la eliminación de una parte de la secuencia de ADN, que conduce a que las regiones a cada lado de la secuencia perdida se unan.

Enzimas de restricción. Enzimas que reconocen secuencias de ADN cortas (habitualmente 4 o 6 pb) y cortan el ADN donde quiera que esas secuencias se encuentren (p. ej., BamH I, Bgl II, EcoR I, Hind III, Pst I y Sac I). Estas secuencias se denominan sitios de restricción.

Exón. Segmento de gen que codifica para una proteína.

Fenotipo. Aspecto de un individuo humano o de una célula. En relación con un carácter genético particular, el fenotipo refleja el genotipo que confiere ese carácter más los efectos del ambiente.

Gen. La unidad de la herencia. En términos bioquímicos, un gen especifica la estructura de una proteína, que es el producto del gen. En términos moleculares, un gen es una cinta de ADN que es transcrita en bloque, una unidad de transcripción.

Genotipo. La constitución genética de un individuo.

Heterocigoto. Individuo con dos alelos diferentes en un locus particular.

Hibridación. Emparejamiento de cadenas de ARN o ADN complementarios para generar un híbrido ADN-ARN o un ADN dúplex.

Intrón. Segmento de un gen que es transcrito pero eliminado en el mensajero maduro (ARNm) y, por tanto, no codifica para una proteína.

Ligamiento. Herencia concurrente de genes como resultado de su localización vecina en el mismo cromosoma.

Locus. Posición en un cromosoma donde se localiza un determinado gen.

Mancha de Northern o *Northern blotting*. Técnica para transferir el ARN desde un gel de agarosa a un filtro de nitrocelulosa o nailon sobre el que pueda ser reconocido mediante una sonda adecuada.

Mancha de Southern o *Southern blotting*. Procedimiento para transferir ADN desnaturalizado desde un gel de agarosa a un filtro de nitrocelulosa o de nailon, donde puede ser reconocido por una sonda apropiada.

Mutación puntual. Cambio de un único par de bases en el ADN.

Mutación. Cambio en la secuencia del ADN genómico.

Oligonucleótido (Oligo). Molécula corta, de ADN de cadena única, habitualmente sintetizada *in vitro*.

Par de bases (pb). Un emparejamiento único de los nucleótidos A con T o G con C en una doble hélice de ADN (en ARN, A se empareja con U).

Plásmido. Molécula de ADN circular extracromosómica de replicación autónoma (p. ej., pBR322 y pUC19).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Técnica para amplificar una secuencia de ADN individual *in vitro*. La reacción es iniciada utilizando un oligonucleótido específico.

Sonda. Un fragmento de ADN que puede utilizarse para hibridar una secuencia de ADN específica a una molécula de ARN.

Vector. Molécula de ADN capaz de replicarse y diseñada específicamente para facilitar el clonado de otra molécula de ADN de interés.

BIBLIOGRAFÍA

1. International Human Genome Sequencing Consortium 2001 Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409:860–921.
2. Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al 2001 The sequence of the human genome. Science 291:1304–1351.
3. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al 1988 Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239:487–491.
4. Sambrook J, Russell DW 2001 Molecular cloning. A laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
5. Association for Molecular Pathology statement. 1999 Recommendations for in-house development and operation of molecular diagnostic tests. American Journal of Clinical Pathology 111:449–463.
6. Schwartz MK 1999 Genetic testing and the clinical laboratory improvement amendments of 1988: present and future. Clinical Chemistry 45:739–745.
7. Williams LO, Cole EC, Lubin IM, et al 2003 Quality assurance in human molecular genetics testing: status and recommendations. Archives of Pathology and Laboratory Medicine 127:1353–1358.
8. Sykes BC 1983 DNA in heritable disease. Lancet ii:787–788.
9. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, et al 1989 Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). Nucleic Acids Research 17:2503––2516.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

10. Old JM, Varawalla NY, Weatherall DJ 1990 Rapid detection and prenatal diagnosis of β-thalassaemia: studies in Indian and Cypriot populations in the U.K. Lancet 336:834–837.
11. Wallace RB, Shaffer J, Murphy RF, et al 1979 Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to PhiX174 DNA: the effect of single base pair mismatch. Nucleic Acids Research 6:3543–3547.
12. Saiki RK, Chang CA, Levenson CH, et al 1988 Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and non-radioactive allele specific oligonucleotide probes. New England Journal of Medicine 319: 537–541.
13. Kawasaki E, Saiki R, Erlich H 1993 Genetic analysis using polymerase chain reaction-amplified DNA and immobilised oligonucleotide probes: reverse dot-blot typing. Methods in Enzymology 218:369–381.
14. Old J 1996 Haemoglobinopathies. Prenatal Diagnosis 16: 1181–1186.
15. Clark BE, Thein SL 2004 Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. Clinical and Laboratory Haematology 26: 159–176.
16. Liu YT, Old JM, Miles K, et al 2000 Rapid detection of alpha-thalassaemia deletions and alpha-globin triplication by multiplex polymerase chain reactions. British Journal of Haematology 108:295–299.
17. Bain BJ, Chapman C 1998 A survey of current United Kingdom practice for antenatal screening for inherited disorders of globin chain synthesis. UK Forum for Haemoglobin Disorders. Journal of Clinical Pathology 51:382–389.
18. Cumming AM, Shiach CR 1999 The investigation and management of inherited thrombophilia. Clinical and Laboratory Haematology 21:77–92.
19. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, et al 1996 A common genetic variation in the 3¢-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. Blood 88:3698–3703.
20. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, et al 1994 Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. Nature 369:64–67.
21. Greaves M, Baglin T 2000 Laboratory testing for heritable thrombophilia: impact on clinical management of thrombotic disease annotation. British Journal of Haematology 109: 699–703.
22. Vidal F, Farssac E, Altisent C, et al 2001 Rapid hemophilia A molecular diagnosis by a simple DNA sequencing procedure: identification of 14 novel mutations. Thrombosis and Haemostasis 85:580–583.
23. Lakich D, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE, et al 1993 Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. Nature Genetics 5:236–241.
24. Wion KL, Tuddenham EGD, Lawn R 1986 A new polymorphism in the factor VIII gene for prenatal diagnosis of haemophilia A. Nucleic Acids Research 14:4535–4542.
25. Liu Q, Nozari G, Sommer SS 1998 Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in hemophilia A. Blood 92:1458–1459.
26. Secker-Walker LM, Craig JM, Hawkins JM, et al 1991 Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia in adults: age distribution. BCR-breakpoint and prognostic significance. Leukaemia 5:196–199.
27. Macintyre EA, Delabesse E 1999 Molecular approaches to the diagnosis and evaluation of lymphoid malignancies. Seminars in Hematology 36:373–389.
28. Biondi A, Rambaldi A, Pandolfi PP, et al 1992 Molecular monitoring of the myl/retinoic acid receptor-a fusion gene in acute promyelocytic leukaemia by polymerase chain reaction. Blood 80:492–497.
29. Delabesse E, Asnafi V, Macintyre E 2003 Application of molecular biology techniques to malignant haematology. Transfusion Clinique et Biologique 10:335–352.
30. Cross NCP, Melo JV, Lin F, et al 1994 An optimised multiplex polymerase chain reaction for detection of BCR–ABL fusion mRNAs in haematological disorders. Leukaemia 8: 186–189.
31. Lin F, Goldman JM, Cross NCP 1994 A comparison of the sensitivity of blood and bone marrow for the detection of minimal residual disease in chronic myeloid leukaemia. British Journal of Haematology 86:683–685.
32. Cross NCP, Lin F, Chase A et al 1993. Competitive polymerase chain reaction to estimate the number of BCR–ABL transcripts in chronic myeloid leukaemia after bone marrow transplantation. Blood 82:1929–1936.
33. Gabert J, Beillard E, van der Velden et al 2003. Standardization and quality control studies of "real-time" quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia—a Europe Against Cancer program. Leukaemia 17:2318–2357.
34. Menisk E, van de Locht A. Schattenberg A 1998 Quantification of minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukaemia patients using real-time quantitative RT-PCR. British Journal of Haematology 102:768–774.
35. Holland PM, Abramson RD, Watson R, et al 1991 Detection of specific polymerase chain reaction product by utilising the 5′-3′ exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase. Proceedings of the National Academy of Science 88:7276–7280.
36. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, et al 1995 Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. PCR Methods Application 4:357–362.
37. Kaeda J, Chase A, Goldman JM 2002 Cytogenetic and molecular monitoring of residual disease in chronic myeloid leukaemia. Acta Haematologica 107:64–75.
38. Hochhaus A, Lin F, Reiter A, et al 1996 Quantification of residual disease in chronic myeloid leukaemia on interferon—alpha therapy by competitive polymerase chain reaction. Blood 87:1549–1555.
39. Hughes T, Kaeda J, Branford S et al 2003 For the International Randomised Study of Interferon Versus STI571 (IRIS) Study Group. Frequency of Major Molecular Responses to Imatinib or Interferon Alfa plus Cytarabine in Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukaemia. New England Journal of Medicine 349:1397–1431.
40. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, et al 2003 Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98–3936. Leukemia 17:2257–2317.
41. Deane M, Norton JD 1990 Detection of immunoglobulin gene rearrangement in B lymphoid malignancies by polymerase chain reaction gene amplification. British Journal of Haematology 74:251–256.
42. Cave H, van der Werff ten Bosch J, Suciu S, et al 1998 Clinical significance of minimal residual disease in childhood

acute lymphoblastic leukemia. New England Journal of Medicine 339:591–598.
43. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G et al 2003 Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. Leukemia 17:1013–1034.
44. Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM 1991 Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Annals of Biochemistry 196:80–83.
45. Van Deerlin VM, Leonard DG 2000 Bone marrow engraftment analysis after allogeneic bone marrow transplantation. Clinical and Laboratory Medicine 20:197–225.
46. Mann K, Fox SP, Abbs SJ et al 2001 Development and implementation of a new rapid aneuploidy diagnostic service within the UK National Health Service and implications for the future of prenatal diagnosis. Lancet 358:1057–1061
47. Beutler E, Vulliamy TJ 2002 Hematologically important mutations: glucose-6-phosphate dehydrogenase. Blood Cells Molecules and Disease 28:93–103.
48. Harris S, Jones DB 1997 Optimisation of the polymerase chain reaction. British Journal of Biomedical Science 54: 166–173.
49. Chomczynski P, Sacchi N 1987 Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. Annals of Biochemistry 162:156–159.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

22 Miscelánea

S. Mitchell Lewis

Pruebas de respuesta de fase aguda 511
- Velocidad de sedimentación globular 511
- Método estandarizado por el ICSH 513
- Viscosidad plasmática 515
- Viscosidad de sangre total 515

Anticuerpos heterófilos en el suero: diagnóstico de la mononucleosis infecciosa 515
- Pruebas de detección para mononucleosis infecciosa 516
- Demostración de células de lupus eritematoso 517

Eritropoyetina 517

Pruebas suplementarias para el paludismo 518

PRUEBAS DE RESPUESTA DE FASE AGUDA

La respuesta inflamatoria a la lesión tisular (respuesta de fase aguda) incluye la alteración en la concentración de proteínas séricas, especialmente incrementos en fibrinógeno, haptoglobina, ceruloplasmina, inmunoglobulinas (Ig) y proteína C reactiva (PCR), y una disminución de la albúmina. Los cambios tienen lugar en la infección aguda, durante las fases activas de la inflamación crónica, en el cáncer, en el daño tisular agudo (p. ej., tras el infarto agudo de miocardio) o en las lesiones físicas.

La medición de la respuesta de fase aguda es un indicador útil de la presencia y extensión de la inflamación o del daño tisular, así como de la respuesta al tratamiento. Las pruebas habituales son la determinación de la PCR y la medición de la velocidad de sedimentación globular (VSG); algunos estudios han sugerido que la viscosidad plasmática también es un indicador útil, pero existe cierto debate sobre el valor relativo de estas pruebas[1,2].

Existen equipos disponibles sensibles y precisos para la determinación de la PCR; pequeños incrementos en las concentraciones séricas de PCR pueden detectarse antes de que se hagan aparentes los signos clínicos, mientras que a medida que un proceso que produce daño tisular se resuelve, la concentración sérica disminuye rápidamente hacia cero, o al menos vuelve al intervalo normal (menos de 5 mg/l). La VSG responde más lentamente a la actividad inflamatoria aguda y no es sensible a cambios pequeños en la actividad de la enfermedad. Es menos específica que la PCR porque también se ve influida por las inmunoglobulinas (que no son reactantes de fase aguda) y por la anemia. Además, debido a que la velocidad de cambio de la VSG es más lenta que la de la PCR, rara vez refleja de forma cronológicamente precisa el curso de la actividad de la enfermedad y el estado clínico del paciente tan fielmente como la PCR. Sin embargo, la VSG es una prueba de detección útil, y el método manual convencional de VSG es simple, barato y no depende de energía eléctrica, por lo que es un método adecuado que realizar a la cabecera del paciente.

Debido a que la determinación de PCR es una prueba bioquímica habitualmente realizada en el laboratorio de bioquímica clínica, no se discutirá en mayor detalle aquí.

Velocidad de sedimentación globular

El método de determinación de la VSG recomendado por el International Council for Standardization in Haematology (ICSH)[3] y también por varias autoridades del país[4] se basa en el comunicado por Westergren, quien desarrolló la prueba en 1921 para estudiar a pacientes con tuberculosis pulmonar.

En esencia se trata de la medición tras 1 h de la sedimentación de los eritrocitos en sangre diluida, dentro de un tubo de cristal abierto, de 30 cm de longitud, colocado verticalmente en una plataforma.

Método convencional Westergren

El tubo recomendado es un tubo de plástico transparente rígido o de cristal, recto, de 30 cm de longitud y no menos de 2,55 mm de diámetro. El calibre debe ser uniforme, manteniéndose dentro de un 5% la variación de su interior. Sobre los últimos 20 cm se extiende una escala graduada en mm. El tubo debe estar limpio y seco y no tener polvo.

Si es reutilizable, antes de ser reutilizado debe ser cuidadosamente lavado con agua del grifo, luego enjuagado con agua destilada o desionizada y dejado a secar. Existen rejillas especialmente diseñadas con tornillos niveladores ajustables que pueden sostener los tubos de sedimentación

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

firmemente en una posición exactamente vertical. La rejilla debe estar construida de forma que no haya escapes de sangre fuera del tubo. Lo habitual es llevar a cabo las pruebas de sedimentación a temperatura ambiente (18-25 °C). La sedimentación se suele acelerar conforme aumenta la temperatura, y si la prueba va a ser llevada a cabo a una temperatura ambiente superior, debe establecerse un intervalo de normalidad para dicha temperatura. Excepcionalmente, cuando existen aglutininas frías de elevada amplitud térmica, la sedimentación se produce con menor rapidez conforme la temperatura aumenta y se aproxima a los 37 °C.

Como disolvente debe prepararse una solución de 109 mmol/l citrato trisódico (32 g/l $Na_3Ca_6H_5O_7.2H_2O$). Filtrar a través de un filtro de microporo (0,22 mm) dentro de un frasco estéril. Puede permanecer almacenada durante varios meses a 4 °C pero debe descartarse si se enturbia debido al crecimiento de mohos.

Método

Se puede o bien extraer y depositar la sangre venosa en ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y luego diluir una muestra en la proporción de 1 volumen de citrato por 4 volúmenes de sangre, o bien recoger la sangre directamente en la solución de citrato. La prueba debe realizarse en la muestra diluida dentro de las primeras 4 h de recogida de la sangre, aunque se puede permitir una dilación de hasta 6 h siempre que la sangre se mantenga a 4 °C. La sangre en EDTA se puede utilizar dentro de las primeras 24 h si el espécimen se mantiene a 4 °C, con la condición de que a 1 volumen de 109 mmol/l (32 g/l) de citrato trisódico se le añadan 4 volúmenes de sangre inmediatamente antes de realizar la prueba.

Mezclar la muestra sanguínea con cuidado y a continuación llevarla al tubo de Westergren hasta cubrir la marca de 200 mm, siempre por medio de una tetilla o de un instrumento mecánico, y nunca empleando la succión bucal. Colocar el tubo exactamente vertical y dejarlo en reposo durante exactamente 60 min, libre de vibraciones y de corrientes de aire y no directamente expuesto a la luz solar. A continuación, leer la altura de la columna de hematíes tomando como referencia la señal de 1 mm más cercana que quede por encima del límite superior de la columna de células sedimentadas. El resultado se expresa como VSG = x mm en 1 h. Algunas veces la capa superior de eritrocitos es más irregular, especialmente cuando el recuento de reticulocitos es elevado.

Intervalo en sujetos sanos

Los valores medios y el límite superior para el 95% de los adultos normales se ofrece en la tabla 22.1. Existe un incremento progresivo con la edad, pero para los mayores de 70 años es difícil definir una población estrictamente sana para determinar los valores normales.

En el recién nacido, la VSG suele ser baja. En la infancia y en la adolescencia tiene los mismos valores que en adultos normales, sin diferencias entre niños y niñas. Se incrementa en el embarazo, especialmente en las últimas fases, y es independiente de la existencia de anemia[5].

Métodos modificados

Longitud del tubo

La longitud del tubo no es una dimensión crítica para la prueba siempre que se sostenga firmemente en un dispositivo adecuado. No obstante, el tubo debe ser suficientemente largo para asegurar que el empaquetado celular no se inicia antes de que se complete la prueba.

Tubos de plástico

Se han recomendado varios materiales plásticos (p. ej., polipropileno y policarbonato) como sustitutos del cristal en los tubos de Westergren. No obstante, no todos los plásticos tienen las mismas propiedades y debe demostrarse que la VSG con los tubos elegidos puede ser reproducible y no es modificada por el plástico.

Tubos de cristal desechables

Los tubos de cristal desechables deben ser suministrados limpios y secos y listos para ser usados. Es necesario demostrar que ni el material del tubo ni el proceso de limpiado del fabricante afectan a la VSG.

Método capilar

Existen tubos cortos de calibre más estrecho que el tubo estándar, fundamentalmente para realizar la prueba en niños. Sin embargo, este tipo de tubos no se suelen usar ya, y es necesario establecer intervalos normales o un factor de corrección para convertir los resultados a una aproximación a la VSG por el método de Westergren.

Tiempo

La sedimentación se mide después de que tenga lugar la agregación y antes de que las células comiencen a empa-

Tabla 22.1. Intervalos de velocidad de sedimentación globular en estado de salud

Edad (años)	Límite superior 95% (mm en 1 h)
Varones	
17–50	10
51–60	12
61–70	14
>70	Aproximadamente 30
Mujeres	
17–50	12
51–60	19
61–70	20
>70	Aproximadamente 35
Embarazo	
Primera mitad	48 (62 sí anémica)
Segunda mitad	70 (95 sí anémica)

quetarse (v. pág. 514), habitualmente a los 18-24 min. De la velocidad a la que ha tenido lugar la sedimentación durante este período de tiempo se obtiene la que tendría lugar a 60 min y se es convertida a un equivalente de VSG convencional mediante un algoritmo[6].

Tubo inclinado

Los eritrocitos sedimentan más rápidamente cuando corren por la pared de un tubo inclinado. Este fenómeno se ha incorporado en sistemas automatizados en los que el criterio de evaluación se lee tras 20 min con el tubo inclinado con un ángulo de 18 grados con respecto a la vertical. Esto ha demostrado proporcionar resultados comparables a los del método convencional[7].

Anticoagulante

La sangre en EDTA puede utilizarse sin diluirse en citrato, al menos si el hematocrito (Hto) está por debajo de 0,36 (hemoglobina <110 g/l); se obtienen resultados menos precisos cuando el Hto es mayor. Las lecturas a partir de muestras no diluidas deben ser posteriormente ajustadas como se hace para los métodos estandarizados (v. más adelante).

Debido al riesgo biológico de contaminación sanguínea inherente a la utilización de tubos abiertos, se recomienda en la actualidad que siempre que sea posible se utilice en la práctica de rutina un sistema cerrado. Existen métodos manuales que evitan transferir la sangre al tubo específico de sedimentación. Los sistemas cerrados automáticos utilizan sangre recogida en tubos especiales al vacío que contienen citrato o EDTA. Se toma una muestra a través de una tapa perforable y luego se diluye automáticamente en el sistema si es necesario. Algunos sistemas utilizan tubos a un ángulo de 18 grados para obtener resultados más rápidamente, y un modelo de Ves-matic (Diesse) también incorpora la centrifugación.

Siempre que se planee utilizar un método o tubo diferente, se debe llevar a cabo una prueba preliminar para evaluar la precisión y comparar los resultados con los obtenidos por el método estandarizado descrito en la siguiente sección.

Método estandarizado por el ICSH

El método estandarizado por el ICSH tiene como objetivo proporcionar un método de referencia para verificar la fiabilidad de cualquier modificación de la prueba. Se lleva a cabo con sangre en EDTA no diluida en citrato, utilizando tubos de Westergren como se describió previamente y aplicando una fórmula desarrollada de forma experimental para su corrección[3].

Seleccionar 10 muestras de sangre con Hto entre 0,30-0,36 y, si es posible, con VSG en un amplio intervalo entre 15 y 105 mm; si es necesario, ajustar el Hto dentro del rango requerido centrifugando los especímenes, eliminando una cantidad adecuada de plasma o eritrocitos y resuspendiendo a continuación las células a través de un mezclado concienzudo.

Inmediatamente antes de llenar el tubo de VSG, mezclar el espécimen mediante al menos ocho inversiones completas. Medir la VSG en cada espécimen (no diluido) por el método estandarizado de Westergren.

Ajustar la lectura en ausencia de dilución como sigue:

$$\text{VSG corregida (mm en 1 h)} = (\text{VSG no diluida} \times 0{,}86) - 12$$

Al mismo tiempo, medir la VSG por el método que va a ser verificado en muestras de los mismos especímenes o con sangre recogida separadamente de los mismos sujetos de acuerdo con los requerimientos especificados (p. ej., directamente en tubos que contienen citrato).

Cualquier método nuevo puede considerarse satisfactorio si el 95% de los resultados se sitúan dentro de los límites dados en la tabla 22.2. Sin embargo, dado que la VSG puede sufrir la influencia de diversas variables no controladas, el método de referencia no puede utilizarse para ajustar las medidas que se obtienen. Por tanto, si el nuevo método arroja lecturas distintas, será necesario establecer un intervalo normal específicamente para el método.

Control de calidad

El método estandarizado puede también utilizarse como un procedimiento de control de calidad para las pruebas de rutina. Seleccionar una muestra de sangre con un Hto entre 0,30 y 0,36 y llevar a cabo la prueba de VSG por el método de rutina y por el método estandarizado como se describió previamente. Aplicar la fórmula para obtener la VSG corregida para la muestra no diluida.

La prueba obtiene un control de calidad satisfactorio si los resultados por el método de rutina no difieren de los obtenidos mediante el método ICSH estandarizado más allá de los límites presentados en la tabla 22.2.

Este procedimiento puede ser muy laborioso para ser aplicado de manera rutinaria; en vez de ello, actualmente se dispone de preparaciones de sangre completa estabilizadas que son adecuadas como un control diario para su uso con diferentes sistemas automatizados (p. ej., *ESR-Chex [Streck]*).[8] Tres o cuatro muestras de sangre en EDTA conservadas a 4 °C también servirán como control al día siguiente[9].

Otro procedimiento de control es calcular la media acumulada diaria, que es relativamente estable cuando al menos se evalúan 100 especímenes de forma sistemática cada día en una instalación adecuada (v. pág. 567). Un coeficiente de variación menor del 15% entre los conjuntos de mediciones diarias parece ser un índice satisfactorio para monitorizar el rendimiento de un instrumento[9].

Método semicuantitativo sobre portaobjetos

Se ha sugerido un método para demostrar una potenciación de la agregación/adhesión de los eritrocitos permitiendo que una gota de sangre con citrato se seque sobre un portaobjetos. La estimación de la cantidad de agregación celular sobre la extensión de sangre mediante análisis de imagen proporciona una medida semicuantitativa de la respuesta de fase aguda que parece correlacionarse con la VSG[10].

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 22.2. Valores de velocidad de sedimentación globular (mm) para verificación de la comparabilidad entre el método de trabajo (rutina) con el método estandarizado del ICSH[3]

Método estandarizado[a]	Límites del método de trabajo[b]	Método estandarizado[a]	Límites del método de trabajo[b]	Método estandarizado[a]	Límites del método de trabajo[b]
15	3–13	45	18–37	75	40–68
16	4–14	46	18–38	76	40–69
17	4–15	47	19–38	77	41–70
18	4–15	48	20–39	78	42–71
19	5–16	49	20–40	79	43–72
20	5–17	50	21–41	80	44–73
21	6–17	51	22–42	81	45–74
22	6–18	52	22–43	82	45–76
23	6–19	53	23–44	83	46–77
24	7–19	54	24–45	84	47–78
25	7–20	55	24–46	85	48–79
26	8–21	56	25–47	86	49–80
27	8–21	57	26–48	87	50–82
28	9–22	58	26 –49	88	51–83
29	9–23	59	27–50	89	52–84
30	10–24	60	28–51	90	53–85
31	10–25	61	29–52	91	53–86
32	11–25	62	29–53	92	54–88
33	11–26	63	30–54	93	55–89
34	12–27	64	31–56	94	56–90
35	12–28	65	32–57	95	57–91
36	13–29	66	32–58	96	58–93
37	13–30	67	33–59	97	59–94
38	14–30	68	34–60	98	60–95
39	14–31	69	35–61	99	61–96
40	15–32	70	35–62	100	62–98
41	15–33	71	36–63	101	63–99
42	16–34	72	37–64	102	64–100
43	17–35	73	38–65	103	65–101
44	17–36	74	39–66	104	66–103
					67–104

[a] Método estandarizado. Sangre total con un hematocrito de 0,35 o inferior anticoagulada con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).
[b] Método de trabajo. Cuatro volúmenes de sangre EDTA más 1 volumen de sangre diluido en citrato o de sangre EDTA sin diluyente. El método de trabajo propuesto es válido si el 95% de los resultados se encuentran dentro de los límites indicados. Reproducción con permiso del *Journal of Clinical Pathology*.

Mecanismo de la sedimentación globular

La velocidad de caída de los eritrocitos se ve influida por un número de factores interrelacionados[1]. Básicamente, depende de la diferencia de peso específico entre los eritrocitos y el plasma, pero se ve muy influida por la medida en que los eritrocitos forman «pilas de monedas» o *rouleaux*, que sedimentan más rápidamente que las células individuales. Otros factores que afectan la sedimentación incluyen la relación de eritrocitos con respecto al plasma (esto es, el Hto), la viscosidad del plasma, la verticalidad u otra situación del tubo de sedimentación, el calibre del tubo y la dilución (si se ha realizado) de la sangre.

La formación de *rouleaux* y el amontonamiento de eritrocitos que se asocia con un aumento de la VSG se deben fundamentalmente a las concentraciones de fibrinógeno y otras proteínas de fase aguda (p. ej., haptoglobina, ceruloplasmina, α_1 glucoproteína ácida, α_1 antitripsina y PCR). La formación de *rouleaux* es también potenciada por las inmunoglobulinas. La albúmina la retrasa. La sangre desfibrinada normalmente sedimenta con extrema lentitud (no más rápido de 1 mm en 1 h) a menos que la concentración sérica de globulinas se incremente o la relación entre globulinas y albúmina sea inadecuadamente alta.

La anemia, al alterar la proporción de eritrocitos con respecto al plasma, estimula la formación de *rouleaux* y acelera la sedimentación. También en la anemia, los factores celulares pueden afectar a la sedimentación. Por tanto, en una anemia por deficiencia de hierro, una reducción en la capacidad intrínseca de los eritrocitos de sedimentar puede ser compensada por los efectos aceleradores de un incremento en la proporción de plasma.

Puede observarse que la sedimentación tiene lugar en tres estadios: un estadio preliminar de al menos unos pocos minutos durante los cuales aparecen *rouleaux* y se forman los agregados de hematíes; a continuación, un período en el que los agregados se hunden a velocidad constante, y finalmen-

te, una fase durante la que la velocidad de sedimentación disminuye conforme las células agregadas se empaquetan en el fondo del tubo. Es obvio que, a mayor longitud del tubo utilizado, mayor es la duración del segundo período y mayor puede parecer la velocidad de sedimentación.

Significación clínica de la medición de la velocidad de sedimentación globular

Globalmente, la VSG es útil como prueba de detección en la exploración rutinaria de cualquier paciente. Aunque es un fenómeno inespecífico, su medición es útil clínicamente en trastornos asociados con un incremento en la producción de proteínas de fase aguda. En la artritis reumatoide o en la tuberculosis proporciona un índice de la evolución de la enfermedad y es de valor considerable en el diagnóstico de la arteritis de la temporal y en la polimialgia reumática. Se suele emplear cuando se sospecha un mieloma múltiple, pero cuando el mieloma es no secretor o productor de cadenas ligeras, una VSG normal no excluye este diagnóstico.

Una VSG elevada tiene lugar como dato precoz en el infarto de miocardio[11]. Aunque no puede entenderse que una VSG normal excluya la presencia de una enfermedad orgánica, el hecho es que una gran mayoría de las infecciones agudas o crónicas y la mayoría de las enfermedades neoplásicas y degenerativas se asocian con cambios en las proteínas plasmáticas, lo que conduce a una aceleración de la sedimentación. Una VSG incrementada en sujetos que son VIH positivos parece ser un marcador predictivo precoz de progresión hacia el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida)[12]. La VSG es menos útil en países donde las enfermedades crónicas están muy extendidas; sin embargo, un estudio ha demostrado que VSG muy altas (mayores de 100 mm/h) tienen una especificidad de 0,99 y un valor predictivo positivo de 0,9 para una infección aguda o crónica[13]. La VSG es mayor en mujeres que en varones y se correlaciona con las diferencias sexuales en las concentraciones de fibrinógeno[14]. En el embarazo normal tiene lugar un incremento del fibrinógeno, lo que resulta en un incremento de la agregación de eritrocitos y una sedimentación elevada[5,15]. La VSG se ve influida por la edad, la fase del ciclo menstrual y las medicaciones tomadas (p. ej., corticosteroides, píldoras anticonceptivas, etc.); es especialmente baja (0-1 mm) en la policitemia, la hipofibrinogenemia y la insuficiencia cardíaca congestiva y cuando hay alteraciones en los eritrocitos como poiquilocitosis, esferocitosis o células falciformes.

Viscosidad plasmática

La VSG y la viscosidad plasmática en general se incrementan paralelamente entre sí[1]. Sin embargo, la viscosidad plasmática depende fundamentalmente de la concentración de las proteínas plasmáticas, especialmente del fibrinógeno, y no se afecta con la anemia. Los cambios en la VSG pueden retrasarse en 24-48 h con respecto a los cambios en la viscosidad plasmática, y la viscosidad parece reflejar la gravedad clínica de la enfermedad más exactamente que la VSG[16].

Hay varios tipos de viscosímetros, incluyendo los tipos rotacional y capilar, que son adecuados para su utilización rutinaria[1]. Sin embargo, esto ha quedado anticuado con el advenimiento de los métodos automatizados y en tubo cerrado de medición de VSG, y quizás su principal aplicación se da en investigación de la sospecha de hiperviscosidad. La prueba real debe llevarse a cabo como se describe en el manual de instrucciones para el instrumento utilizado en concreto.

Valores de referencia

Cada laboratorio debe establecer sus propios valores de referencia. Como guía general, el ICSH ha registrado que con el viscosímetro capilar de Harkness el plasma normal tiene una viscosidad de 1,16-1,33 mPa/s[a] a 37 °C y 1,50-1,72 mPa/s a 25 °C[17]. La viscosidad plasmática es menor en el recién nacido (0,98-1,25 mPa/s a 37 °C), incrementándose hasta los valores del adulto hacia el tercer año de vida, y es ligeramente superior en el anciano. No hay diferencias significativas en la viscosidad plasmática entre varones y mujeres o en el embarazo. Es notablemente constante en estado de salud, con escasas o nulas variaciones diurnas, y no se afecta por el ejercicio. Por tanto es probable que un cambio de sólo 0,03-0,05 mPa/s sea clínicamente significativo.

Viscosidad de sangre total

La viscosidad de la sangre total refleja sus propiedades reológicas; es influida por el Hto, la viscosidad plasmática, la agregación y la deformabilidad de los eritrocitos. Es especialmente sensible al Hto, con el cual está íntimamente correlacionada. En la interpretación clínica de su medición debe también tenerse en cuenta la interacción de los eritrocitos con los vasos sanguíneos, que influyen en gran medida en el flujo sanguíneo *in vivo*.

Se han publicado guías para la medición de la viscosidad sanguínea y la deformabilidad de los eritrocitos[18]. Los viscosímetros rotacionales y capilares son adecuados para medir la viscosidad sanguínea; la deformabilidad puede medirse registrando la velocidad a la que los eritrocitos en suspensión pasan a través de un filtro con poros de 3-5 mm de diámetro.

ANTICUERPOS HETERÓFILOS EN EL SUERO: DIAGNÓSTICO DE LA MONONUCLEOSIS INFECCIOSA

La mononucleosis infecciosa (MI) es causada por el virus de Epstein-Barr[19]. Cada célula infectada contiene antígenos de cápside viral, que dan lugar a anticuerpos heterófilos específicos. Antes de que esta identidad se conociese, Paul y Bunnell[20] los presentaron como aglutininas dirigidas contra eritrocitos de oveja; no son, en realidad, específicas

[a] Si se expresa en poise (P), 1cP = 1 mPa/s.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

de los eritrocitos de oveja sino que reaccionan también con los eritrocitos de caballo y buey, pero no con los eritrocitos humanos. Se trata de globulinas IgM, que están inmunológicamente relacionadas, pero son anticuerpos distintos de los que tienen lugar en respuesta a los antígenos Forssman. Estos últimos están ampliamente presentes en los tejidos animales; aparecen a títulos bajos en individuos sanos y a títulos altos en la enfermedad del suero y en algunas leucemias y linfomas[21,22]. En estas enfermedades distintas a la MI, el anticuerpo puede ser absorbido por células de cobaya. Por tanto, para el diagnóstico de MI, es necesario demostrar que el anticuerpo presente tiene las características del anticuerpo de Paul-Bunnell (es decir, se une a los eritrocitos de buey pero no a las de extracto de riñón de cobaya). Ésta es la base de las pruebas de absorción de la MI. Se han desarrollado pruebas con anticuerpos inmunofluorescentes (p. ej., Launce Diagnostics Product 487003) que distinguen el anticuerpo IgM, que aparece a títulos altos en la fase inicial de la MI y disminuye durante la convalecencia, del anticuerpo IgG, que persiste a títulos altos durante años después de la infección[23,24] y que también aparece en otras infecciones aparte de la MI[19,25].

Pruebas de detección para mononucleosis infecciosa

La prueba cuantitativa de Paul-Bunnell descrita en ediciones previas es laboriosa y no está ya en uso, habiendo sido reemplazada por pruebas rápidas de cribado. Existe un buen número de equipos comerciales (v. más adelante), pero los reactivos también pueden prepararse en el propio laboratorio[26].

Reactivos

Sueros. Suero del paciente (fresco o inactivado mediante calentamiento a 56 °C durante 30 min) y sueros controles positivo y negativo.

Suspensión de eritrocitos. Suspensión al 20% de sangre de caballo en 109 mmol/l (32 g/l) de citrato trisódico. Antes de usar, la suspensión debe mezclarse bien por inversión repetida. Para la prueba de cribado, no es necesario lavar las células.

Emulsión de riñón de cobaya. Véase la página 590.

Suspensión de eritrocitos de buey. Véase la página 591.

Método

Colocar 1 gota grande (unos 30 µl) de la emulsión de riñón de cobaya y 1 gota grande de suspensión de eritrocitos de buey en dos casillas adyacentes sobre un cristal de ópalo. Añadir 1 gota de suero del paciente o del control en las casillas adyacentes a cada una de las anteriores. Repartir 10 µl de suspensión de sangre de caballo en la esquina de cada casilla mediante una micropipeta de plástico desechable, evitando contactar con las gotas de cada casilla. Con un aplicador de madera, mezclar los reactivos (emulsión de riñón de cobaya o suspensión de células de buey, suero y suspensión de sangre de caballo) y a continuación examinar a simple vista la aglutinación, utilizando una luz oblicua en ángulo sobre fondo oscuro. Los controles séricos positivo y negativo siempre deben estudiarse al mismo tiempo. Sus imágenes se muestran en la figura 22.1.

Interpretación

Positiva

La aglutinación es mayor en la casilla que contiene la emulsión de riñón de cobaya que en la que contiene la suspensión de eritrocitos de buey.

Negativa

No aparece aglutinación en ninguna de las casillas.

Distintos fabricantes han comercializado equipos diagnósticos con los reactivos para este método de cribado. Otros equipos se basan en la aglutinación de eritrocitos de caballo estabilizados o partículas de látex cubiertas de antígenos a las que se unen los anticuerpos de MI. Una evaluación extensa de 14 pruebas sobre portaobjetos realizada por la UK Medical Devices Agency (MDA) demostró que presentaban una sensibilidad entre 0,87 y 1,00 y una especificidad entre 0,97 y 1,00, con una precisión global (positiva y negativa) en el orden del 91-100%[27]. Se han comunicado reacciones falsas positivas en el paludismo, la toxoplasmosis y la infección por citomegalovirus, así como en enfermedades autoinmunes e incluso, ocasionalmente, en casos sin enfermedades subyacentes aparentes[28,29]. Reacciones falsas negativas aparecen si la prueba se practica antes de que la concentración de anticuerpos heterófilos haya aumentado o, al contrario, cuando haya disminuido. También pueden aparecer falsos negativos en pacientes muy jóvenes o muy ancianos. En el estudio MDA del Reino Unido el mejor rendimiento se conseguía con la prueba

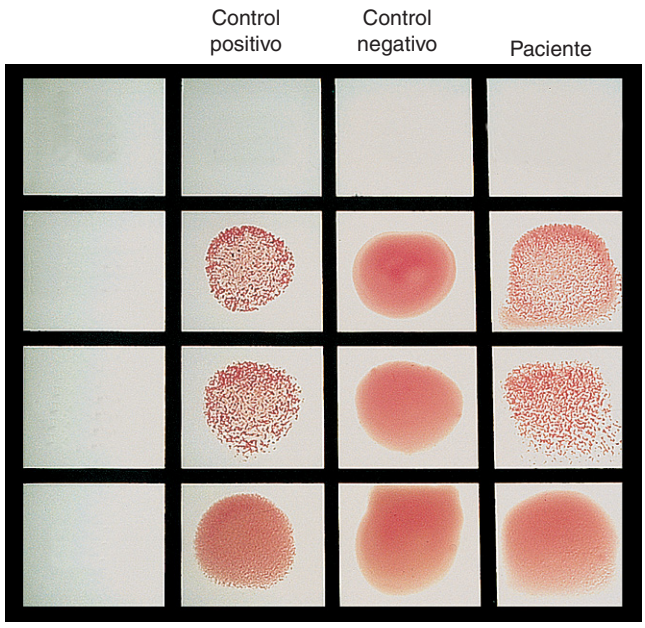


Figura 22.1. **Prueba de detección en portaobjetos para la mononucleosis infecciosa. Fila superior:** riñón de cobaya. **Fila intermedia:** suspensión de células de buey. **Fila inferior:** solución salina.

Clearview *(Unipath)*, que utiliza glucoproteína eritrocitaria bovina marcada sobre látex; el anticuerpo heterófilo de la MI se une a esta glucoproteína para formar un complejo que aparece como una banda en la ventana de resultado (fig. 22.2). La prueba puede llevarse a cabo con sangre total diluida así como con plasma o suero.

También existen pruebas de cribado basadas en ensayos de inmunoabsorción enzimática (ELISA) e inmunocromatográficos. Estas pruebas son más elaboradas que la prueba de cribado en portaobjetos descrita previamente, pero es menos probable que den un resultado falso.

Valor clínico

Las pruebas de determinación de anticuerpos heterófilos son útiles para el diagnóstico. Los anticuerpos suelen aparecer ya los días 4.º a 6.º de enfermedad y casi siempre se pueden encontrar hasta el día 21. Desaparecen por regla general en 4-5 meses. No hay unanimidad sobre cómo se producen las frecuentes reacciones falsas negativas en casos de MI verdadera. A veces los anticuerpos característicos se desarrollan muy tarde en el curso de la enfermedad, quizás semanas o incluso meses después de que el paciente enferme, y también se sabe que una reacción positiva puede ser transitoria y que los anticuerpos pueden encontrarse a títulos tan bajos que pueden no detectarse o producir reacciones de aglutinación anómalas cuando se asocian con el anticuerpo natural a títulos similares. Por todas estas razones, es difícil establecer de forma categórica que un paciente en particular no tiene o no producirá anticuerpos. Se han demostrado anticuerpos específicos para el virus de Epstein-Barr en el suero del 86% de los pacientes con rasgos clínicos y/o hematológicos de MI[30].

Con respecto a las reacciones falsas positivas, no hay evidencia sustancial de que los sueros que contienen aglutininas a concentración alta y producen reacciones típicas de MI no se encuentren alguna vez en otras enfermedades no complicadas por MI. En concreto, los títulos de anticuerpos heterófilos en los linfomas son similares a los hallados en pacientes no seleccionados que no padecen MI[31].



Figura 22.2. Detección de mononucleosis infecciosa con prueba sobre portaobjetos de *Clearview*. La ventana inferior muestra un resultado positivo con anticuerpos unidos a glucoproteína de eritrocitos bovinos marcados con látex. La ventana superior es un control de la glucoproteína no ligada.

Demostración de células de lupus eritematoso (células LE)

Los anticuerpos antinucleares, o factores antinucleares (FAN), aparecen en el suero en un amplio espectro de trastornos autoinmunes, incluyendo el lupus eritematoso sistémico (LES). Pueden detectarse y medirse de forma cuantitativa mediante métodos inmunológicos sensibles y específicos. Algunos fabricantes comercializan equipos de pruebas de evaluación cualitativa. Estos equipos han dejado obsoleta la prueba de células de LE. Este método se basaba en la reacción entre los autoanticuerpos del paciente y los antígenos nucleares, con una fagocitosis subsiguiente por los neutrófilos, que puede demostrarse morfológicamente. Durante muchos años, éste fue el criterio estándar para el diagnóstico de LES[32] y fue descrito en las ediciones octava y novena de este libro. Se trata de un método sobrepasado por las pruebas inmunológicas, pero puede ser útil si no se dispone de éstas.

ERITROPOYETINA

La eritropoyetina regula la producción de eritrocitos. Es una glucoproteína termoestable con un peso molecular de aproximadamente 34 kDa. Se produce fundamentalmente en el riñón. Sólo una pequeña cantidad se detecta en plasma u orina normales.

Se dispone de una forma pura de eritropoyetina humana obtenida a partir de ADN recombinante (r-HuEpo) para métodos de ensayo diagnóstico mediante ELISA, inmunoensayo enzimático y ensayo radioinmunitario. Los equipos comercializados son fiables y sensibles[33], aunque existe cierta variabilidad intermétodo[34]. Sin embargo, no es práctico realizar el ensayo en laboratorios donde la prueba se requiere sólo de forma ocasional. Es preferible derivar la muestra de suero a un laboratorio donde la prueba se realice de forma regular o a un centro designado de referencia. En el Reino Unido existe un servicio suprarregional de ensayo[b] donde el análisis se realiza por ELISA.

Los resultados se expresan en unidades internacionales de acuerdo con la referencia al estándar internacional (OMS). Éste fue inicialmente un extracto urinario, y se dispone de una preparación con una potencia de 10 UI por

[b] Véase www.sas_centre.org/centres/hormones/london_Kings.html

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

ampolla[35]. El estándar actual ha sido establecido para la r-HuEpo con una potencia de 86 UI por ampolla[36].

Intervalo de referencia

El intervalo normal de referencia en plasma o suero varía considerablemente de acuerdo con el método de ensayo[33]. Para el método ELISA utilizado en el servicio suprarregional del Reino Unido, el intervalo normal es 9,1-30,8 UI/l. Con los equipos comerciales, en condiciones normales, sin anemia, se suele dar en valores de 5-25 UI/l o ligeramente superiores. En niños normales, las concentraciones son las mismas del adulto, excepto en niños menores de 2 meses en los que la concentración es baja[37].

Existe variación a lo largo del día, y los valores más altos se observan durante la noche[38]. En el embarazo, la concentración de eritropoyetina se incrementa conforme avanza la gestación[39].

Significado

Se encuentran concentraciones aumentadas de eritropoyetina en plasma (o suero) en varios tipos de anemias[40], y normalmente existe una relación inversa entre la hemoglobina y la eritropoyetina. En las talasemias la concentración es menor que en la ferropenia para un mismo grado de anemia, pero existe una correlación inversa muy estrecha con el recuento eritrocitario[41]. En la enfermedad renal existe una disminución progresiva de la respuesta de la eritropoyetina a la anemia, y en la insuficiencia renal terminal la concentración es normal o incluso más baja de lo normal a pesar de la progresión de la anemia. Puede también aparecer alguna alteración en la producción de eritropoyetina en la anemia de las neoplasias y en asociación con enfermedades inflamatorias crónicas. La concentración de eritropoyetina aumenta en la policitemia secundaria debida a enfermedades respiratorias y cardíacas; en presencia de hemoglobinas anormales con alta afinidad por el oxígeno y en asociación con el carcinoma renal y otros tumores secretores de eritropoyetina como el hepatoma, el fibroma uterino y el carcinoma ovárico[40].

En la policitemia proliferativa primaria («policitemia vera»), la concentración de eritropoyetina plasmática es habitualmente más baja de lo normal incluso cuando la hemoglobina se ha visto reducida por una sangría[42,43]. En la policitemia secundaria, la concentración de eritropoyetina nunca está por debajo de lo normal. El ensayo es de especial utilidad en pacientes con eritrocitosis de causa indeterminada; una eritropoyetina baja tiene una especificidad de 0,92 con una sensibilidad moderada para el diagnóstico de policitemia primaria[42]. Sin embargo, en tales casos puede existir un incremento intermitente en la secreción de eritropoyetina. Por tanto, la determinación de su concentración en una única muestra plasmática puede ser engañosa. Se han hallado niveles bajos en un tercio de los casos de trombocitemia primaria (esencial), especialmente cuando la hemoglobina se encuentra a una concentración normal-alta [42]. La medición de la eritropoyetina plasmática es útil para predecir si un paciente con un síndrome mielodisplásico responderá al tratamiento con eritropoyetina.

Eritropoyesis autónoma *in vitro*

Cuando se cultiva la médula ósea de células mononucleares obtenidas a partir de la sangre, se desarrollarán colonias eritroides (CFU-E) de forma normal sólo cuando exista eritropoyetina en el medio de cultivo. Sin embargo, en la policitemia primaria o vera el crecimiento tendrá lugar en un medio libre de eritropoyetina. En esto se basa un método para realizar el diagnóstico diferencial entre la policitemia primaria y la secundaria[44-46].

Las células mononucleadas se recogen de una muestra sanguínea mediante separación por densidad (v. págs. 58 y 440) y se añaden a un medio de cultivo líquido libre de suero[45,46] o un medio de gel colágeno[47], que a continuación se divide en dos porciones. A una de las partes se le añade 1 UI/ml de Epo. Ambas porciones se tapan e incuban durante 7 días a 37 °C. Después se tiñen con bencidina y se examinan directamente bajo un microscopio invertido o después de hacer varios frotis. Se cuenta el número de grupos de células positivas con bencidina en las muestras libre de eritropoyetina y con eritropoyetina y los resultados se comparan. El diagnóstico de policitemia primaria viene indicado si el crecimiento es aproximadamente equivalente en ambas muestras. Se ha descrito un método en el que se utiliza citometría de flujo con inmunofluorescencia para detectar el crecimiento de las células eritroides después de sólo 2-5 días de cultivo[48].

Trombopoyetina

La trombopoyetina regula el desarrollo de megacariocitos y la producción de plaquetas. Es una proteína producida por el hígado y ha sido purificada a partir del suero[49]. Es considerablemente más grande que la eritropoyetina, con un peso molecular de aproximadamente 335 kDa. Se ha producido una trombopoyetina recombinante humana (rhTPO) y se ha utilizado para preparar un anticuerpo monoclonal y desarrollar una prueba de ELISA sensible y específica. Esta prueba se ha utilizado para medir trombopoyetina en suero normal y en el suero de pacientes con diversos trastornos sanguíneos[50]. El intervalo de normalidad (media ± 2 DE) fue 0,79 ± 0,35 fmol/ml para varones y 0,70 ± 0,26 fmol/ml en mujeres. Se incrementa en las trombocitopenias, siendo especialmente alta en la anemia aplásica con trombocitopenia grave, donde alcanza hasta 18,5 ± 12,4 fmol/ml. En la trombocitemia esencial, se encuentra en el intervalo de 1,01-4,82 fmol/ml[51].

PRUEBAS SUPLEMENTARIAS PARA EL PALUDISMO

Además de la exploración morfológica mediante microscopio (v. cap. 4), hay otros mé-todos de detección para detectar la existencia de paludismo[50].

Métodos inmunológicos

Las pruebas de detección simples con «tira reactiva» o sobre portaobjetos para la detección de *Plasmodium falciparum* se basan en la unión de anticuerpos monoclonales a proteína 2 rica en histidina (HRP-2) que aparece de forma

específica en el caso del *P. falciparum*. Los métodos aplicables son los siguientes:

1. ELISA (*p. ej., ParaSight F [BD]*). Tiene una sensibilidad de 0,95 pero es menos sensible con bajos niveles de parasitemia[50,52]. Es negativa cuando sólo hay gametocitos y no es útil en el período posterior inmediato al tratamiento porque se mantiene positivo durante 1-2 semanas después de la curación clínica y la desaparición de los parásitos de la sangre, haciendo por tanto difícil monitorizar la respuesta al tratamiento[50].
2. Inmunocromatografía (p. ej., *ICT Malaria Pf [Binax]*). Se ha comunicado que presenta una sensibilidad del 100% y una especificidad del 96,2%[53]. Una versión barata de este método, *Falciparum Malaria IC Strip,* es fabricada por el Program for Appropriate Technology for Health (PATH) especialmente como instrumento diagnóstico en áreas endémicas para el paludismo[54].

Hay también equipos capaces de demostrar infección por *P. vivax* combinando el anticuerpo específico de *P. falciparum* HRP-2 con el anticuerpo contra la deshidrogenasa láctica glucolítica del parásito, que aparece en otros tipos de plasmodium[50]. Entre estos equipos se incluye el *ICT Malaria Pf/Pv (Binax)* y el *OptiMAL (Diamed)*. El último tiene una sensibilidad mayor de 0,95 tanto para *P. falciparum* como para *P. vivax*, y tiene la ventaja de que se correlaciona con la viabilidad del parásito, de forma que la prueba es negativa cuando el tratamiento es efectivo[55,56]. Es menos sensible para *P. ovale* y *P. malariae*, y ocasionalmente se produce una lectura falsa positiva como resultado de una reacción cruzada con anticuerpos heterófilos plasmáticos[56].

Con cualquiera de las pruebas de detección debe mantenerse *in mente* la necesidad de confirmar un resultado positivo mediante microscopia. Para el manejo clínico de los pacientes con infección por *P. falciparum*, es esencial examinar una extensión de sangre para obtener una estimación del porcentaje de eritrocitos que están infectados, tanto cuando se realiza el diagnóstico como cuando se monitoriza la respuesta al tratamiento. Sin embargo, las pruebas inmunológicas de detección pueden ser útiles fuera de las horas de rutina del laboratorio si los profesionales de guardia no son expertos en el diagnóstico morfológico.

Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa proporciona resultados altamente sensibles y específicos para el diagnóstico de *P. falciparum* y *P. vivax*. Es útil en estudios epidemiológicos, pero no es práctica como instrumento diagnóstico de rutina cuando se necesitan resultados rápidos[57,58].

BIBLIOGRAFÍA

1. International Committee for Standardization in Haematology 1988 Guidelines on the selection of laboratory tests for monitoring the acute-phase response. Journal of Clinical Pathology 41:1203-1212.
2. Lowe GDO 1994 Annotation: Should plasma viscosity replace the ESR? British Journal of Haematology 86:6-11.
3. International Council for Standardization in Haematology 1993 ICSH recommendations for measurement of erythrocyte sedimentation rate. Journal of Clinical Pathology 46:198-203.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards 2000 Reference and selected procedures for the erythrocyte sedimentation rate (ESR) test (H2-A4). NCCLS, Wayne, PA.
5. van den Broek NR, Letsky EA 2001 Pregnancy and the erythrocyte sedimentation rate. British Journal of Obstetrics and Gynaecology 108:1164-1167.
6. Kallner A, Engervall P, Björkholm M 1994 Kinetic measurement of the erythrocyte sedimentation rate. Upsala Journal of Medical Science 99:179-186.
7. Happe MR, Buttafarono DF, Dooley DP, et al 2002 Validation of the Diesse Mini-Ves erythrocyte sedimentation rate (ESR) analyzer using the Westergren method in patients with systemic inflammatory conditions. American Journal of Clinical Pathology 118:14-17.
8. Garvey BJ, Mahon A, Parker-Williams J, et al 1999 An evaluation of ESR-Chex control material for erythrocyte sedimentation rate determination (MDA 99/28). Medical Devices Agency, Stationery Office, Norwich NR3 IPD.
9. Plebani M, Piva E 2002 Erythrocyte sedimentation rate: use of fresh blood for quality control. American Journal of Clinical Pathology 117:621-626.
10. Rotstein R, Fusman R, Berliner S, et al 2001 The feasibility of estimating the erythrocyte sedimentation rate within a few minutes by using a simple slide test. Clinical and Laboratory Haematology 23:21-25.
11. Froom P, Margaliot S, Caine Y, et al 1984 Significance of erythrocyte sedimentation rate in young adults. American Journal of Clinical Pathology 82:198-200.
12. Lefrère JJ, Salmon D, Doinel C, et al 1988 Sedimentation rate as a predictive marker in HIV infection. AIDS 2:63-64.
13. Fincher RF, Page MI 1986 Clinical significance of extreme elevation of the erythrocyte sedimentation rate. Archives of Internal Medicine 146:1581-1583.
14. Bain BJ 1983 Some influences on the ESR and the fibrinogen level in healthy subjects. Clinical and Laboratory Haematology 5:45-54.
15. Huisman A, Aarnoudse JG, Krans M, et al 1988 Red cell aggregation during normal pregnancy. British Journal of Haematology 68:121-124.
16. Harkness J 1971 The viscosity of human plasma: its measurement in health and disease. Biorheology 8:171-193.
17. International Committee for Standardization in Haematology 1984 Recommendation for selected method for the measurement of plasma viscosity. Journal of Clinical Pathology 37:1147-1152.
18. International Committee for Standardization in Haematology 1986 Guidelines for measurement of blood viscosity and erythrocyte deformability. Clinical Hemorheology 6:439-453.
19. Henle W, Henle GE, Horwitz CA 1974 Epstein-Barr virus specific diagnostic tests in infectious mononucleosis. Human Pathology 5:551-565.
20. Paul JR, Bunnell WW 1932 The presence of heterophile antibodies in infectious mononucleosis. American Journal of Medical Science 183:90.
21. Huh J, Cho K, Heo DS, et al 1999 Detection of Epstein-Barr virus in Korean peripheral T-cell lymphoma. American Journal of Haematology 60:205-214.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

22. Klein G 1994 Epstein-Barr virus strategy in normal and neoplastic B cells. Cell 77:791-793.
23. Strand BC, Schuster TC, Hopkins RF, et al 1981 Identification of an Epstein-Barr virus nuclear antigen by fluoro-immuno-electrophoresis and radioimmuno-electrophoresis. Journal of Virology 38:996-1004.
24. Edwards JMB, McSwiggen DA 1974 Studies on the diagnostic value of an immunofluorescence test for EB virus-specific IgM. Journal of Clinical Pathology 27:647-651.
25. Rea TD, Ashley RL, Russo JE, et al 2002 A systematic study of Epstein-Barr virus serological assays following acute infection. American Journal of Clinical Pathology 117:156-161.
26. Lee CL, Davidsohn I, Panczyszyn O 1968 Horse agglutinins in infectious mononucleosis. II The spot test. American Journal of Clinical Pathology 49:12-18.
27. Garvey BJ, Mahon A, Parker-Williams J, et al 1998 Evaluation report: fourteen commercial IM screening kits (MDA 98/63). Medical Devices Agency, Stationery Office, Norwich NR3 1PD.
28. Reed RE 1974 False-positive monospot tests in malaria. American Journal of Clinical Pathology 61:173-174.
29. Horwitz CA, Henle W, Henle G, et al 1979 Persistent falsely positive rapid tests for infectious mononucleosis. Report of five cases with four-six year follow-up data. American Journal of Clinical Pathology 72:807-811.
30. Evans AS, Niederman JC 1982 EBV-IgA and new heterophile antibody tests in diagnosis of infectious mononucleosis. American Journal of Clinical Pathology 77:555-560.
31. Goldman R, Fishkin BG, Peterson E 1950 The value of the heterophile antibody reaction in the lymphomatous diseases. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 35:681-687.
32. Zinkham WH, Conley CL 1956 Some factors influencing the formation of L. E. cells. A method for enhancing L. E. cell production. Bulletin of the Johns Hopkins Hospital 98:102-119.
33. Marsden JT, Sherwood RA, Peters TJ 1995 Evaluation of six erythropoietin kits. (MDA 95/57) Medical Devices Agency, Stationery Office, Norwich NR3 1PD.
34. Bechensteen AG, Lappin TRJ, Marsden J, et al 1993 Unreliability in immunoassays of erythropoietin: anomalous estimates with an assay kit. British Journal of Haematology 83:663-664.
35. Annable L, Cotes PM, Mussett MV 1972 The second international preparation of erythropoietin, human, urinary, for bioassay. Bulletin of the World Health Organization 47:99.
36. Storring PL, Gaines Das RE 1992 The international standard for recombinant DNA-derived erythropoietin: collaborative study of four recombinant DNA-derived erythropoietins and two highly purified human erythropoietins. Journal of Endocrinology 134:459-484.
37. Hellebostad M, Haga P, Cotes MP 1988 Serum immunoreactive erythropoietin in healthy normal children. British Journal of Haematology 70:247-250.
38. Wide L, Bengtsson C, Birgegard G 1988 Circadian rhythm of erythropoietin in human serum. British Journal of Haematology 72:85-90.
39. Cotes PM, Canning CE, Lind T 1983 Changes in serum immunoreactive erythropoietin during the menstrual cycle and normal pregnancy. British Journal of Obstetrics and Gynaecology 90:304-311.
40. Kendall RG 2001 Erythropoietin. Clinical and Laboratory Haematology 23:71-80.
41. Tassiopoulos T, Konstantopoulos K, Tassiopoulos S, et al 1997 Erythropoietin levels and microcytosis in heterozygous beta-thalassaemia. Acta Haematologica 98:147-149.
42. Messinezy M, Westwood NB, El-Hemaidi I, et al 2002 Serum erythropoietin values in erythrocytoses and in primary thrombocythaemia. British Journal of Haematology 117:47-53.
43. Carneskog J, Safai-Kutti S, Wadenvik H, et al 1999 The red cell mass, plasma erythropoietin and spleen size in apparent polycythaemia. European Journal of Haematology 62:43-48.
44. Weinberg RS 1997 In vitro erythropoiesis in polycythemia vera and other myeloproliferative disorders. Seminars in Hematology 34:64-69.
45. Lemoine F, Najman A, Baillou C, et al 1986 A prospective study of the value of bone marrow erythroid progenitor cultures in polycythemia. Blood 68:996-1002.
46. Beckman BS, Anderson WF, Beltran GS, et al 1983 Diagnostic use of CFU-E formation from peripheral blood in polycythemia vera. Am J Clin Path 79:496-499.
47. Dobo I, Mossuz P, Campos L, et al 2001 Comparison of four serum-free, cytokine-free media for analysis of endogenous erythroid colony growth in polycythemia vera and essential thrombocythemia. Hematology Journal 2:396-403.
48. Manor D, Rachmilewitz EA, Fibach E 1997 Improved method for diagnosis of polycythemia vera based on flow cytometric analysis of autonomous growth of erythroid precursors in liquid culture. Am J Hematology 54:47-52.
49. Kaushansky K 1995 Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. Blood 86:419-431.
50. Hänscheid T 1999 Diagnosis of malaria: a review of alternatives to conventional microscopy. Clinical and Laboratory Haematology 21:235-245.
51. Tahara T, Usuki K, Sato H, et al 1996 A sensitive sandwich ELISA for measuring thrombopoietin in human serum: serum thrombopoietin levels in healthy volunteers and in patients with haemopoietic disorders. British Journal of Haematology 93:783-788.
52. Chiodini PL, Cooke AH, Moody AH, et al 1996 MDA evaluation of the Becton Dickinson ParaSight F test for the diagnosis of Plasmodium falciparum. (MDA 96/33). Medical Devices Agency, Stationery Office, Norwich NR3 1PD.
53. Garcia M, Kirimoama S, Marlborough D, et al 1996 Immunochromatographic test for malaria diagnosis. Lancet 347:1549.
54. Mills CD, Burgess DCH, Taylor HJ, et al 1999 Evaluation of a rapid and inexpensive dipstick assay for the diagnosis of Plasmodium falciparum malaria. Bulletin of the World Health Organization 77:553-558.
55. Moody A, Hunt-Cooke A, Gabbett E, et al 2000 Performance of the OptiMAL malaria antigen capture dipstick for malaria diagnosis and treatment monitoring at the Hospital for Tropical Diseases, London. British Journal of Haematology 109:891-894.
56. Moody AH, Chiodini PL 2002 Non-microscopic method for malaria diagnosis using OptiMAL IT, a second generation dipstick for malaria pLDH antigen detection. British Journal of Biomedical Science 59:228-231.
57. Seesod N, Nopparat P, Hedrum A, et al 1997 An integrated system using immunomagnetic separation polymerase-chain-reaction and colorimetric detection for diagnosis of Plasmodium falciparum. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 56:322-328.
58. Hang VT, Be TV, Thanh CT, et al 1995 Screening donor blood for malaria by polymerase chain reaction. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 89:44-47.

23 Aproximación al diagnóstico y clasificación de los trastornos hematológicos

Imelda Bates y Barbara J. Bain

Presentaciones más frecuentes de los trastornos hematológicos 521
Pruebas de detección iniciales 521
Alteraciones cuantitativas de las células sanguíneas 521
Alteraciones cualitativas de las células sanguíneas 526
Pruebas específicas para los trastornos hematológicos frecuentes 527
Trastornos eritrocitarios 527
Trastornos leucocitarios 527
Otros trastornos 528
Clasificación de las neoplasias hematológicas 529
Clasificación de la leucemia mieloide aguda 529
Clasificación de los síndromes mielodisplásicos 530
Clasificación de la leucemia linfoblástica aguda 532
Clasificación de los trastornos mieloproliferativos 532

PRESENTACIONES MÁS FRECUENTES DE LOS TRASTORNOS HEMATOLÓGICOS

Un recuento celular anormal o una alteración en la morfología de las células sanguíneas no indican necesariamente un problema hematológico primario ya que pueden reflejar una enfermedad no hematológica subyacente o pueden ser consecuencia de ciertas intervenciones terapéuticas. La anemia puede aparecer en muchas enfermedades, pero debe considerarse de origen hematológico primario cuando el paciente presenta esplenomegalia, linfadenopatía, diátesis hemorrágica o trombosis y/o síntomas inespecíficos (malestar, sudación o pérdida de peso). Como con cualquier problema clínico, los primeros pasos para realizar el diagnóstico son la obtención de una historia clínica y farmacológica meticulosa, así como una exploración física completa. El resultado de éstas, en combinación con la edad, el sexo, el origen étnico y la historia familiar y social del paciente, así como el conocimiento de las enfermedades localmente prevalentes, determinará las pruebas de laboratorio subsiguientes.

PRUEBAS DE DETECCIÓN INICIALES

Aunque el conjunto de pruebas hematológicas financiables por los servicios sanitarios clínicos públicos es muy amplio, suelen ser las pruebas más simples las más útiles a la hora de apuntar el diagnóstico. Incluso los laboratorios con pocos recursos habitualmente son capaces de proporcionar un panel de pruebas iniciales como la concentración de hemoglobina (Hb), el recuento leucocitario (RL) y plaquetario (v. cap. 27), y la exploración de un frotis de sangre periférica para realizar un recuento leucocitario diferencial (v. cap. 3) y evaluar la morfología celular (v. cap. 5). Estas pruebas de detección frecuentemente posibilitarán sospechar con rapidez los procesos patológicos subyacentes y apuntar a unas cuantas pruebas diagnósticas clave. La investigación de los problemas hematológicos específicos se aborda en detalle en los capítulos 7 (anemia ferropénica), 8 (anemia megaloblástica), 9, 10 y 11 (anemias hemolíticas), 12 (hemoglobinopatías), y 16 y 17 (trastornos de la coagulación).

Interpretación de las pruebas de detección

Los resultados de las pruebas de laboratorio deben interpretarse teniendo en cuenta las limitaciones de dichas pruebas y las variaciones fisiológicas que tienen lugar con el sexo, la edad, y situaciones como el embarazo y el ejercicio. Las variaciones fisiológicas en los recuentos celulares se detallan en el capítulo 2. Las alteraciones de los eritrocitos, leucocitos o plaquetas pueden ser cuantitativas (aumento o reducción en los números) o cualitativas (aspecto y/o función anormal).

Alteraciones cuantitativas de las células sanguíneas

1. Incremento en el número de células

Incrementos que afectan a más de una línea celular

Un incremento simultáneo en las células de más de una línea celular sugiere que la sobreproducción de células se origina en un precursor temprano. Esto ocurre en los tras-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

tornos mieloproliferativos, en los que puede predominar un tipo celular, como por ejemplo las plaquetas en la trombocitemia esencial y los eritrocitos en la policitemia vera (policitemia proliferativa primaria), pero en los que con frecuencia hay incrementos en las otras líneas celulares. El diagnóstico dependerá de qué expansión de línea celular predomina.

Eritrocitosis

Los incrementos en el número de eritrocitos pueden darse en las siguientes formas:

- *Relativa* (seudopolicitemia). Debida a una reducción del volumen plasmático.
- *Primaria* (policitemia vera). Aparece como parte del espectro de trastornos mieloproliferativos.
- *Secundaria a hipoxia crónica* (p. ej., enfermedad pulmonar crónica, enfermedad cardíaca congénita, hemoglobinas de alta afinidad, etc.) o producción anormal de eritropoyetina.

La policitemia secundaria puede excluirse generalmente mediante la historia clínica y la exploración, la evaluación de la concentración de eritropoyetina sérica y la saturación arterial de oxígeno, y la realización de electroforesis de hemoglobina y ecografía abdominal. La presencia de esplenomegalia es sugestiva de policitemia vera, y este diagnóstico puede confirmarse demostrando un incremento absoluto en el volumen de eritrocitos totales y excluyendo otras causas de eritrocitosis. La medición del volumen eritrocitario y/o plasmático (v. cap. 15) permitirá identificar una seudopolicitemia.

Leucocitosis

Neutrofilia

Los neutrófilos frecuentemente aumentan en número durante el embarazo y en infecciones agudas, inflamaciones, intoxicaciones y tratamiento corticosteroide, así como en la pérdida aguda de sangre o en caso de destrucción celular. La neutrofilia con neutrófilos que muestran una granulación citoplasmática densa (granulación «tóxica») es un hallazgo común en las infecciones bacterianas graves. En ausencia de una causa subyacente, un recuento de neutrófilos elevado con células mieloides inmaduras sugiere una leucemia granulocítica crónica. En este caso están indicados los estudios citogenéticos y moleculares en busca de t(9;22) y del gen de fusión *BCR-ABL* (v. cap. 21).

Linfocitosis

La linfocitosis es característica de ciertas infecciones, especialmente de las infecciones en niños. Puede ser especialmente marcada en la tosferina, la mononucleosis infecciosa, la infección por citomegalovirus, la hepatitis infecciosa, la tuberculosis y la brucelosis. La linfocitosis es también una reacción transitoria frecuente tras el estrés físico grave. Los pacientes ancianos con trastornos linfoproliferativos, incluyendo la leucemia linfocítica crónica y los linfomas, frecuentemente se presentan con linfadenopatía y linfocitosis. La morfología e inmunofenotipificación celular, combinadas con la exploración histológica de la biopsia por trepanación de la médula ósea, se utilizan para clasificar estos trastornos y dar una indicación del manejo y del pronóstico. En ocasiones es difícil diferenciar entre una linfocitosis reactiva y una linfocitosis neoplásica. En esta situación, la inmunofenotipificación, la evidencia inmunofenotípica de una restricción de cadenas ligeras, y la reacción en cadena de la polimerasa para detectar reordenamientos en los genes de inmunoglobulinas o del receptor de células T pueden indicar la presencia de una población monoclonal de linfocitos, apoyando por tanto el diagnóstico de una linfoproliferación neoplásica en vez de reactiva. Si los ganglios linfáticos están agrandados, una aspiración con aguja fina para realizar citología e inmunocitoquímica, o una biopsia de ganglio linfático para la realización de histología e inmunohistoquímica pueden ser de ayuda en el diagnóstico.

Monocitosis

Una monocitosis entre ligera y moderada puede asociarse con algunas infecciones protozoarias, por rickettsias y bacterianas, entre las que se incluyen la malaria, el tifus y la tuberculosis. El aumento del número de monocitos (recuento de monocitos $>1 \times 10^9$/l) en un paciente anciano sugiere una leucemia mielomonocítica crónica o, algunas veces, una leucemia mieloide crónica atípica. Debido a que estas enfermedades entran en el grupo de trastornos mieloproliferativos/mielodisplásicos, el diagnóstico se vería apoyado por el hallazgo de esplenomegalia, alteraciones cuantitativas y cualitativas en otras líneas celulares y una alteración citogenética clonal.

Eosinofilia

La eosinofilia se asocia típicamente con trastornos alérgicos incluidos los fenómenos de hipersensibilidad farmacológica, las enfermedades cutáneas y las infecciones parasitarias. En la mayoría de los casos, la causa viene dada por la historia clínica, que debe incluir los detalles de todas las medicaciones y viajes al extranjero, y por la exploración de la orina y las heces en busca de parásitos o huevos. Se emite un diagnóstico de leucemia eosinofílica crónica si existe un incremento de blastos en la sangre o en médula o si hay una evidencia citogenética o molecular de un clon mieloide anormal. El síndrome hipereosinofílico idiopático es un caso poco habitual de eosinofilia en el que la liberación del contenido de los gránulos eosinofílicos produce daños en el corazón, los pulmones y otros tejidos. Éste es un diagnóstico de exclusión, sólo realizado cuando mediante una investigación detallada se han excluido todas las causas conocidas. Es necesario excluir de forma específica la leucemia eosinofílica y la eosinofilia inducida por citocinas resultante de la presencia de un clon neoplásico de células T antes de diagnosticar una enfermedad como síndrome hipereosinofílico idiopático.

Basofilia

La basofilia como hallazgo aislado es infrecuente. Sin embargo, es un dato frecuente en los trastornos mieloprolife-

rativos, y los basófilos pueden ser especialmente prominentes en la leucemia granulocítica crónica. En esta enfermedad, un recuento de basófilos creciente puede ser la primera indicación de una transformación a un curso más agresivo.

Trombocitosis

La trombocitosis suele asociarse a enfermedades infecciosas e inflamatorias como la osteomielitis y la artritis reumatoide. Las causas hematológicas de trombocitosis incluyen pérdidas sanguíneas crónicas, destrucción de eritrocitos, esplenectomía y rebote tras recuperación de una supresión de médula ósea. Bajo estas circunstancias, un incremento moderado en el recuento plaquetario (p. ej., 400-800 × 10^9/l) habitualmente no conlleva consecuencias patológicas. La trombocitemia primaria (esencial) pertenece al espectro de trastornos mieloproliferativos y se caracteriza por un recuento plaquetario elevado persistente (con frecuencia se define de forma arbitraria como superior a 600 × 10^9/l) y complicaciones trombóticas o hemorrágicas. Posteriores investigaciones para confirmar la trombocitemia primaria incluyen la exploración de la médula ósea en busca de un incremento del número de megacariocitos o de la existencia de megacariocitos anormales, así como los análisis citogenéticos.

2. Reducción del número de células

Reducciones en más de una línea celular

La reducción del número de células tiene lugar por un incremento en la destrucción, una reducción de la producción o un incremento de su retención en el bazo u otros órganos. La reducción en la producción de células puede ser resultado de una anemia aplásica, carencia de nutrientes hematínicos como ácido fólico o vitamina B_{12} o interferencia con la hematopoyesis normal por infiltración (p. ej., leucemia; linfoma; mieloma múltiple; carcinoma metastático, frecuentemente con mielofibrosis secundaria; etc.), infección (p. ej., infección por virus de la inmunodeficiencia humana [VIH], tuberculosis, leishmaniasis, etc.) o exposición a toxinas (p. ej., alcohol) o fármacos mielosupresores (p. ej., hidroxicarbamida[a] o busulfán). Ciertas neoplasias mieloides (p. ej., mielofibrosis «idiopática») y los síndromes mielodisplásicos (SMD) se caracterizan por citopenia, y ésta es también algunas veces una característica de la leucemia mieloide aguda (LMA). Una causa relativamente frecuente de reducción global en las células circulantes es el secuestro de células en un bazo marcadamente grande (hiperesplenismo), lo que puede ser secundario a síndromes como la mielofibrosis y la hipertensión portal. El examen de un aspirado de médula ósea y de un espécimen de biopsia por trepanación suele ser útil para determinar la causa de una bicitopenia o de una pancitopenia para las que no se ha hallado una causa obvia.

[a] Previamente conocida como hidroxiurea.

Anemia

Hay muchas causas de anemia, y una clasificación lógica sería aquella basada en el mecanismo de su producción:

1. Producción de eritrocitos disminuida.
2. Acortamiento de la vida de los eritrocitos.
3. Pérdida de sangre.
4. Secuestro esplénico.

En la práctica, si la causa no es inmediatamente aparente a partir de las circunstancias clínicas pero se dispone de un analizador automático de recuento sanguíneo, la clasificación de acuerdo con el tamaño celular es más práctica. La selección de exploraciones que se llevarán a cabo a continuación viene determinada por el volumen corpuscular medio (VCM) y por la morfología eritrocitaria, además de por las características clínicas del proceso. La anemia por tanto puede dividirse a grandes rasgos en tres tipos:

1. Microcítica (VCM bajo).
2. Macrocítica (VCM alto).
3. Normocítica (VCM normal).

Un VCM bajo puede asociarse con una baja hemoglobina corpuscular media (HCM). Menos frecuente es hallar una baja concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), lo que se correlaciona con hipocromía.

Las figuras 23.1 a 23.3 son algoritmos que proporcionan una secuencia ordenada de pruebas que se deben realizar para los diferentes tipos de anemia sobre la base de estos índices. La exploración de una extensión sanguínea habitualmente sugerirá la vía más rápida para el diagnóstico; la confirmación puede requerir pruebas más específicas, que se plantean en el texto. La presencia de punteado basófilo en un paciente con eritrocitos microcíticos sugiere rasgo talasémico o envenenamiento por plomo. Un aspecto dimórfico en la extensión sanguínea es típico de una anemia sideroblástica congénita pero más frecuentemente es el resultado de una deficiencia de hierro que está respondiendo al tratamiento. Los cuerpos de Pappenheimer sugieren que una anemia microcítica es resultado de una eritropoyesis sideroblástica.

Anemia microcítica (v. fig. 23.1)

La causa más frecuente de anemia en todo el mundo es el déficit de hierro. Puede sospecharse esta causa a partir de un VCM bajo y de la presencia de eritrocitos microcíticos e hipocrómicos. La confirmación de laboratorio del déficit de hierro puede incluir mediciones de ferritina sérica y de hierro sérico, junto con bien la capacidad de unión de hierro, bien la determinación de transferrina, protoporfirina eritrocitaria y tinción de aspirados de médula ósea para hierro (v. cap. 4). Un diagnóstico de déficit de hierro requiere buscar la causa del mismo. Esta búsqueda debe incluir preguntas explícitas acerca de pérdidas sanguíneas e insuficiente ingesta en la dieta y puede requerir la exploración de las heces en busca de parásitos y sangre oculta, la exploración endoscópica del tracto gastrointestinal para excluir enfer-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

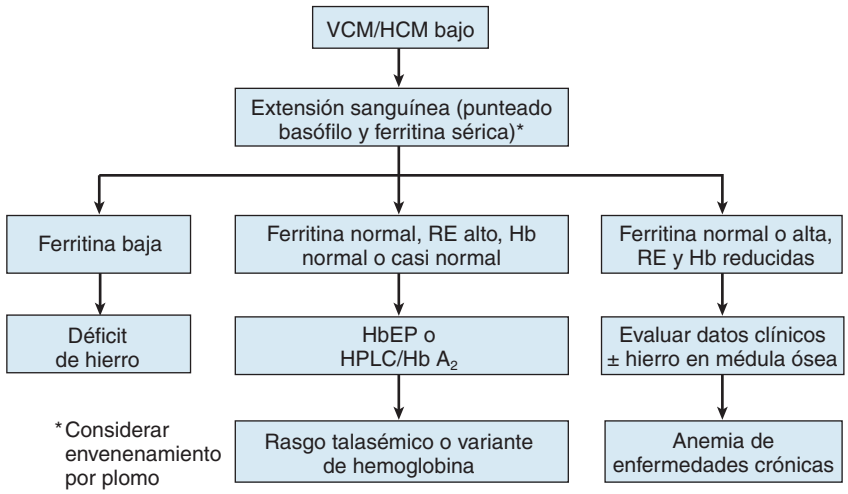


Figura 23.1. Investigación de una anemia microcítica hipocrómica. HbEP, electroforesis Hb; HPLC, cromatografía líquida de alta resolución; RE: recuento eritrocitario.

medades malignas ocultas y pruebas serológicas o de otro tipo para enfermedad celíaca. El diagnóstico diferencial de anemia ferropénica incluye la anemia por enfermedad crónica. Las características clínicas y de laboratorio propias de inflamación pueden sugerir este diagnóstico, que se confirma por la demostración de ferritina sérica normal o alta, bajo hierro sérico y bajas transferrina y capacidad de fijación de hierro.

Las talasemias también causan microcitosis, pero tanto la talasemia α como la talasemia β se suelen asociar con un incremento en el recuento eritrocitario y una Hb normal o casi normal a pesar de la considerable reducción del VCM o de la HCM, mientras que en el déficit de hierro el VCM y la HCM no disminuyen hasta que la Hb se encuentra significativamente reducida. Investigaciones más complejas, como la electroforesis de hemoglobina, la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o la determinación de Hb A_2 y Hb F suelen confirmar el diagnóstico de rasgo talasémico β. El diagnóstico de rasgo talasémico α es más difícil; la detección de las infrecuentes inclusiones HbH suele ser posible en el rasgo talasémico α, pero el diagnóstico definitivo requiere un análisis de ADN. El diagnóstico de rasgo talasémico α^+ tiene menos importancia clínica; las inclusiones HbH pueden no detectarse y, por tanto, es preciso proceder al análisis de ADN.

Anemias macrocíticas (v. fig. 23.2)

Un VCM alto con macrocitos ovales y neutrófilos hipersegmentados sugiere deficiencia de ácido fólico o vitamina B_{12} y es una indicación de que debe realizarse una cuantificación de estas vitaminas (v. cap. 8); investigaciones ulteriores podrían incluir estudios de malabsorción, pruebas serológicas para enfermedad celíaca o bien pruebas para detectar anticuerpos antifactor intrínseco o un prueba de Schilling para detectar una anemia perniciosa (v. pág. 155). Si se detectan anticuerpos contra el factor intrínseco, no es necesario realizar una prueba de Schilling. Un VCM alto puede también asociarse al consumo excesivo de alcohol y a la enfermedad hepática o a fármacos como la hidroxicarbamida o la zidovudina. La macrocitosis resultante de la hemólisis crónica se asocia con incrementos en los números de eritrocitos inmaduros, que parecen ligeramente más grandes y más azules que los eritrocitos normales en una

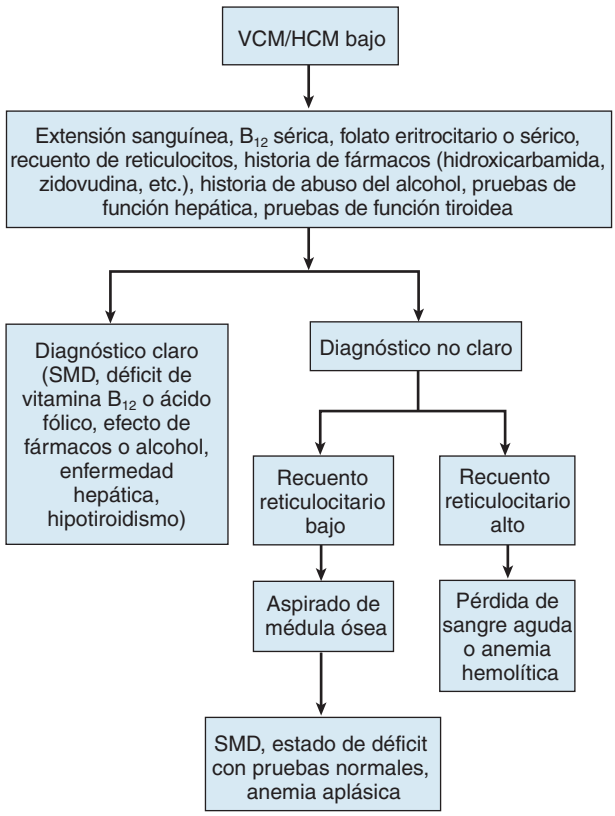


Figura 23.2. Investigación de una anemia macrocítica. SMD: síndrome mielodisplásico.

extensión de sangre periférica con tinción de Romanowsky. Para confirmar la reticulocitosis pueden utilizarse la tinción supravital de extensiones sanguíneas (v. págs. 35-36) o un recuento reticulocitario automatizado. La anemia no tratada asociada con policromasia es probable que indique pérdida de sangre o hemólisis. La combinación de fragmentos eritrocitarios, trombocitopenia y policromasia indica una anemia hemolítica microangiopática y debe impulsar la realización de nuevas pruebas diagnósticas como recuento plaquetario, estudios de coagulación, evaluación de la función renal y una búsqueda de infección o enfermedad neoplásica. Estas nuevas evaluaciones son urgentes porque los datos anteriores pueden estar indicando la existencia de una púrpura trombótica trombocitopénica, que requiere tratamiento rápido mediante plasmaféresis.

Anemia normocítica (v. fig. 23.3)

La anemia normocítica normocrómica suele ser el resultado de una enfermedad crónica subyacente, no hematológica. Las pruebas deben dirigirse a explorar la existencia de insuficiencia renal, infecciones subclínicas, enfermedades autoinmunes y neoplasias. En presencia de anemia, la ausencia de policromasia, unida a reticulocitopenia, apunta a un fallo primario de la eritropoyesis o a la existencia de pérdidas sanguíneas o hemólisis sin producción eritrocitaria compensatoria. El examen de la médula ósea puede ser útil para demostrar las causas hematológicas de una anemia normocítica normocrómica como una anemia aplásica o un síndrome mielodisplásico precoz. La tinción de hierro puede también ser útil para demostrar la existencia de un bloqueo en el metabolismo del hierro, lo que sugiere una anemia asociada a enfermedad inflamatoria crónica.

Leucopenia

Neutropenia

Una vez que se ha excluido una variación fisiológica, la etnia o una neutropenia familiar o cíclica (v. págs. 18-19), las causas no hematológicas de neutropenia aislada que deben considerarse incluyen la infección no controlada, los trastornos autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico, la irradiación, los fármacos (en especial, los agentes anticancerosos) y la leucemia de linfocitos grandes granulares. El examen de médula ósea puede ayudar a determinar si el problema es el resultado de la destrucción periférica (precursores mieloides en médula aumentados) o de un fracaso en las células madre (ausencia de precursores mieloides en la médula ósea). En la neutropenia inducida por fármacos el aspecto de la médula ósea es muy característico ya que existe una relativa escasez de neutrófilos maduros, como lo es también en el síndrome de Kostmann (agranulocitosis genética infantil), en el que existe una interrupción de la maduración en el estadio promielocítico.

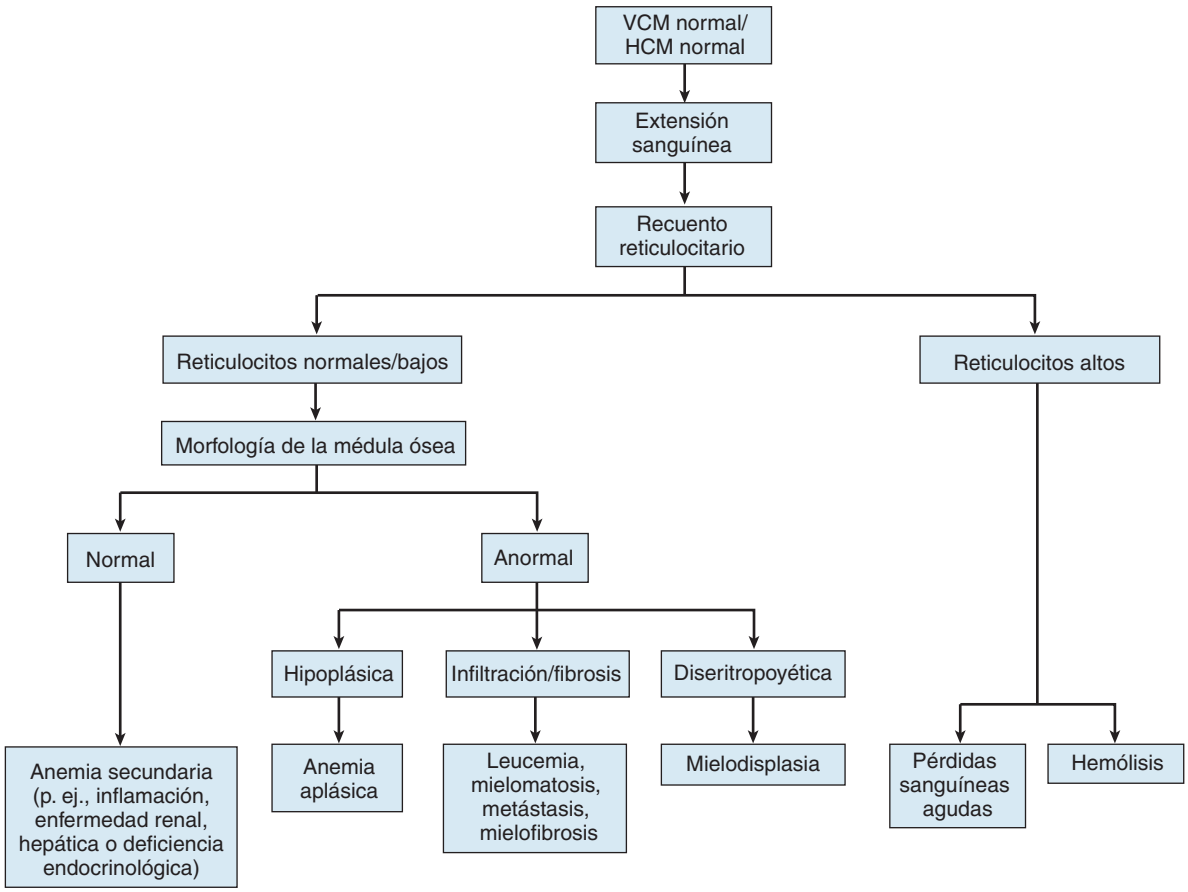


Figura 23.3. Investigación de una anemia normocítica normocrómica.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Número reducido de linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos

El número de linfocitos, eosinófilos y basófilos puede verse conjuntamente reducido por agresiones como la cirugía, los traumatismos y la infección. La combinación de linfopenia y neutrofilia es frecuente en las alteraciones hematológicas que acompañan al síndrome respiratorio agudo grave. La linfopenia, especialmente a expensas de células CD4, puede aparecer en la infección por VIH y el fracaso renal. La monocitopenia ($<0{,}2 \times 10^9$/l) es característica de la leucemia de células peludas, que se asocia a pancitopenia, histología de médula ósea típica y linfocitos con citología e inmunofenotipo característicos.

Trombocitopenia

La trombocitopenia suele ser un hallazgo aislado, y es importante asegurar que el resultado de laboratorio refleja una verdadera reducción del recuento plaquetario antes de embarcarse en nuevas pruebas diagnósticas. Las causas frecuentes de trombocitopenia espuria incluyen la presencia de coágulos en la muestra, la agregación plaquetaria y el satelitismo plaquetario. La agregación plaquetaria, que puede observarse en la extensión sanguínea, puede tener lugar *in vitro* como resultado de la existencia de un autoanticuerpo dependiente de temperatura o dependiente de anticoagulante. Se pueden observar pequeños agregados plaquetarios en presentaciones que se han realizado directamente a partir de una muestra por pinchazo en el dedo. En la mayor parte de los casos, la trombocitopenia verdadera es resultado de quimioterapia anticancerosa, infección por VIH, autoanticuerpos (púrpura trombocitopénica autoinmune «idiopática»), otros fármacos (como los diuréticos tiazídicos), consumo excesivo de alcohol, hiperesplenismo y SMD (en el anciano). Las circunstancias clínicas, junto con el examen de la médula ósea y las pruebas serológicas relevantes, deben posibilitar el diagnóstico diferencial entre estas situaciones. La trombocitopenia asociada con otras complicaciones, como trombosis, alteración de la función renal o hepática y anemia hemolítica, debe impulsar la investigación de otras enfermedades como la púrpura trombótica trombocitopénica o el síndrome HELLP (hemólisis + elevación de la concentración de las enzimas hepáticas + bajo recuento plaquetario). En el estudio de una trombocitopenia, el examen de médula ósea debe realizarse precozmente porque es útil para excluir enfermedades como la leucemia aguda, que puede presentarse como una trombocitopenia aislada.

Pancitopenia

La pancitopenia (reducción en el recuento leucocitario, la concentración de Hb y el recuento plaquetario) es la mayoría de veces el resultado de la quimioterapia anticancerosa, la infección por VIH, el hiperesplenismo, o la infiltración o insuficiencia de la médula ósea. Una exploración cuidadosa de una extensión sanguínea es importante si la causa de la pancitopenia no queda clara a partir de la historia clínica. Si aquélla no revela la causa, pueden llegar a ser necesarios el aspirado de médula ósea y la biopsia por trepanación.

Alteraciones cualitativas de las células sanguíneas

En estado normal, sólo las formas celulares más maduras aparecen en sangre periférica. Las células más inmaduras, en estadios más precoces, como los eritrocitos nucleados, los eritrocitos policromáticos, los mielocitos y los metamielocitos pueden ser liberados de la médula ósea en condiciones en las que la médula ósea está hiperactiva (p. ej., en estados hemolíticos agudos o en la recuperación después de la supresión) o cuando presenta una alteración funcional. Su presencia en sangre periférica indica que se está produciendo una hematopoyesis activa.

Alteraciones de todas las líneas celulares

La combinación de anisopoiquilocitosis, macrocitosis leve, neutrófilos hipogranulares con morfología nuclear alterada y anisocitosis plaquetaria, muchas veces acompañadas de alteraciones cuantitativas, es virtualmente patognomónica de síndrome mielodisplásico. Estos datos se reflejan en la médula ósea por la alteración del desarrollo normal y en la asincronía de maduración núcleo:citoplasma. Los estudios citogenéticos pueden confirmar el diagnóstico cuando las alteraciones citológicas son menores y también pueden contribuir a determinar el pronóstico.

Alteraciones de líneas celulares individuales

Eritrocitos

Las alteraciones congénitas de los eritrocitos afectan a la estructura (p. ej., esferocitosis, eliptocitosis, etc.) y al contenido (p. ej., hemoglobinopatías, enzimopatías, etc.) produciendo con frecuencia cambios morfológicos típicos (v. cap. 5). El tipo de cambios guiará la realización de posteriores investigaciones hacia el análisis de las proteínas estructurales, electroforesis de hemoglobina, o ensayos mediante HPLC y estudio de las enzimas eritrocitarias. Las alteraciones eritrocitarias adquiridas pueden ayudar a indicar la patología subyacente. Por ejemplo, las células diana pueden impulsar la investigación de la función hepática, mientras que los «hematíes en pilas de monedas» o *rouleaux* pueden indicar la necesidad de descartar un mieloma múltiple o enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide.

Leucocitos

Las alteraciones congénitas de los neutrófilos son infrecuentes, pero pueden observarse alteraciones morfológicas similares (p. ej., células Pelger-Huët) en enfermedades adquiridas como el síndrome mielodisplásico. Los cambios reactivos en los linfocitos incluyen citoplasmas basófilos, amplios, típicamente observados en la mononucleosis infecciosa, enfermedad que puede diagnosticarse utilizando un prueba de detección adecuada (v. pág. 516) o, si ésta es negativa, por demostración de anticuerpos tipo inmunoglobulina M (IgM) contra el virus de Epstein-Barr. Estos linfocitos atípicos pueden algunas veces ser difíciles de diferenciar de las células circulantes de linfoma. La histología de médula ósea, combinada con los estudios de inmunofenotipado y determinación de la clona-

lidad de linfocitos mediante la demostración de restricción de cadenas ligeras o mediante estudios de reordenamiento genético, pueden ser necesarios para alcanzar una conclusión firme.

Plaquetas

Las plaquetas que funcionan mal pueden no presentar una morfología necesariamente anormal, aunque algunas veces son hipogranulares o más grandes de lo normal. Un recuento plaquetario normal con una prolongación del tiempo de hemorragia es característico de un trastorno de la función plaquetaria, pero algunos pacientes con función plaquetaria anormal también tienen trombocitopenia. Los trastornos hereditarios de la función plaquetaria son infrecuentes y habitualmente se presentan como diátesis hemorrágica. Cuando se sospecha un trastorno cualitativo plaquetario, las plaquetas deben examinarse para evaluar su tamaño y para detectar las características citológicas de un síndrome de las plaquetas grises. Las alteraciones se pueden dividir a grandes rasgos en dos categorías: alteraciones de la membrana plaquetaria (p. ej., síndrome de Bernard-Soulier, trombastenia de Glanzmann, etc.) y alteraciones de la función secretora plaquetaria (p. ej., enfermedades por depósito). En comparación, los trastornos adquiridos de la función plaquetaria son más frecuentes. Las enfermedades hematológicas asociadas a disfunción plaquetaria incluyen los trastornos mieloproliferativos y mielodisplásicos y las disproteinemias. Muchos fármacos de prescripción frecuente pueden interferir con la función plaquetaria, incluyendo la aspirina y los agentes antiinflamatorios no esteroideos, mientras que las enfermedades sistémicas, en especial la insuficiencia renal crónica y la derivación cardiopulmonar, se asocian con una tendencia hemorrágica como resultado de defectos plaquetarios cualitativos. La mayoría de estos defectos funcionales adquiridos no se asocian con anormalidad alguna en el aspecto de las plaquetas, pero en los trastornos mielodisplásicos, y en menor medida en el trastorno mieloproliferativo, pueden aparecer plaquetas hipogranulares y gigantes.

PRUEBAS ESPECÍFICAS PARA LOS TRASTORNOS HEMATOLÓGICOS FRECUENTES

Los trastornos hematológicos más frecuentes se destacan en las siguientes secciones, con sugerencias sobre las pruebas que pueden ser útiles en la confirmación del diagnóstico. Las listas no pretenden ser exhaustivas porque el rango de pruebas del que se dispone en cada centro dependerá de la disponibilidad de tecnología y personal experimentado. Las exploraciones presentadas a continuación son aquellas que más probablemente podrán llevarse a cabo en un departamento de hematología general.

Trastornos eritrocitarios

Anemias microcíticas hipocrómicas

Para más información, véanse los capítulos 7 y 12.

- Determinación de ferritina sérica o hierro junto con la capacidad de unión total de hierro o transferrina, protoporfirina eritrocitaria.
- Aspirado de médula ósea con tinción para hierro.
- Examen de sangre oculta en las heces, estudios de pérdidas sanguíneas con eritrocitos marcados con ^{51}Cr.
- Pruebas de malabsorción.
- Pruebas serológicas de enfermedad celíaca.
- Exploración endoscópica con biopsia.
- Plomo sérico (si se sospecha envenenamiento por plomo).

Si se sospecha una talasemia:

- Electroforesis de hemoglobina más mediciones de Hb F y Hb A_2 o HPLC.
- Preparación para hemoglobina H.
- Estudios familiares.
- Análisis de ADN.

Anemias macrocíticas

Cuando se demuestra una maduración eritroide macrocítica, megaloblástica, se debe proceder a ulteriores investigaciones como se describe en el capítulo 8. Si la extensión sanguínea es típica de anemia megaloblástica, con frecuencia es posible practicar pruebas y exploraciones relevantes sin necesidad de recurrir al aspirado de médula ósea. La macrocitosis puede ser secundaria a situaciones frecuentes como el consumo excesivo de alcohol, enfermedad hepática, síndrome mielodisplásico, administración de hidroxicarbamida e hipotiroidismo. La reticulocitosis de cualquier causa puede también incrementar el VCM.

Anemia aplásica

- Aspirado de médula ósea y biopsia por trepanación.
- Prueba de suero acidificado (prueba de Ham) para hemoglobinuria paroxística nocturna (examen de la orina para hemosiderina y fosfatasa alcalina granulocitaria si la prueba de Ham es positiva).
- Determinaciones de vitamina B_{12} y ácido fólico.
- Estudios virales, en especial de los virus de Epstein-Barr y de hepatitis.

Si se sospecha anemia de Fanconi:

- Estudios de sensibilidad cromosómica a la ruptura del ADN con un agente que sea capaz de producir entrecruzamientos.
- Radiografías de manos y antebrazos.

Anemias hemolíticas

Un proceso hemolítico puede sospecharse por la presencia de un descenso de la concentración de hemoglobina, reticulocitosis e ictericia, junto con un incremento en el nivel de bilirrubina no conjugada (v. caps. 9 a 11).

Trastornos leucocitarios

La sangre puede presentar un aspecto completamente normal en algunos pacientes con trastornos leucocitarios (p. ej., linfoma, mielomatosis, deficiencia inmune, disfunción de

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

neutrófilos, etc.). Los cambios en el número de leucocitos o en su morfología pueden tener lugar rápidamente como respuesta a trastornos locales o sistémicos. La investigación de los trastornos leucocitarios suele requerir con mayor frecuencia el examen de la médula ósea de lo que suele ocurrir en el estudio de los trastornos eritrocitarios, especialmente cuando se sospecha un trastorno primario de médula ósea. En las leucemias crónicas, el examen de la médula ósea puede añadir poco al diagnóstico, pero el patrón de infiltración puede tener significación pronóstica (p. ej., en la leucemia linfocítica crónica). La distribución de leucocitos se aprecia mejor en las biopsias realizadas por trepanación, lo que resulta especialmente importante en los linfomas.

Leucemia aguda
- Aspirado de médula ósea.
- Biopsia de médula ósea por trepanación si no se obtuvo un aspirado de médula ósea adecuado.
- Tinciones histoquímicas.
- Inmunofenotipificación sanguínea o en médula ósea, a menos que sea claramente mieloide.
- Análisis citogenético.
- Estudios moleculares (p. ej., hibridación por fluorescencia *in situ*) para reordenamientos de oncogenes específicos.

Neutropenia
- Recuentos neutrofílicos seriados para la neutropenia cíclica.
- Pruebas para anticuerpos antineutrófilos.
- Aspirado de médula ósea y biopsia por trepanación.
- Panel de autoanticuerpos e investigaciones de lupus eritematoso sistémico.
- Determinaciones de vitamina B_{12} y ácido fólico.
- Prueba de suero acidificado (prueba de Ham).

Leucemia mieloide crónica
- Aspirado de médula ósea.
- Análisis citogenético.
- Estudios moleculares (p. ej., hibridación por fluorescencia *in situ*) para el reordenamiento *BCR-ABL*.
- Puntuación en fosfatasa alcalina granulocitaria, si no se dispone de análisis citogenéticos y moleculares.

Trastornos linfoproliferativos crónicos/linfadenopatía
- Panel serológico para mononucleosis infecciosa, infección por citomegalovirus, infección por VIH y toxoplasmosis (si se sospecha una causa infecciosa).
- Aspirado de médula ósea y biopsia por trepanación (para la detección de la presencia y distribución de linfocitos anormales).
- Inmunofenotipado.
- Electroforesis de proteínas séricas y concentraciones de inmunoglobulinas.
- Ácido úrico sérico, calcio y lactato deshidrogenasa (LDH).
- Biopsia de ganglio linfático (aspiración o quirúrgica).
- Análisis citogenético o molecular incluyendo investigación de reordenamientos génicos de cadenas pesadas de inmunoglobulinas o receptor de célula T si el diagnóstico de linfoma es dudoso.
- Estudios radiológicos (rayos X, ecografía, tomografía computarizada, resonancia magnética, etc.).

Mielomatosis
- Aspirado de médula ósea.
- Biopsia de médula ósea por trepanación si no se obtiene un aspirado celular.
- Electroforesis de proteínas séricas y concentraciones de inmunoglobulinas.
- Determinaciones de albúmina y calcio séricos.
- β_2-microglobulina.
- Detección y cuantificación de proteína de Bence-Jones en orina (muestra aleatoria y orina de 24 h).
- Pruebas de función renal.
- Radiología ósea.
- Cuantificación y proporción de cadenas libres en suero.

Otros trastornos

Trastornos mieloproliferativos
- Mediciones de volumen sanguíneo, masa eritrocitaria y volumen plasmático (para policitemia).
- Aspirado de médula ósea y biopsia por trepanación.
- Saturación arterial de oxígeno y nivel de carboxihemoglobina.
- Ecografía abdominal.
- Fosfatasa alcalina granulocitaria.
- Vitamina B_{12} (o capacidad de unión de B_{12}).
- Ácido úrico sérico.
- Análisis de JAK2.

Mielodisplasia
- Aspirado de médula ósea y biopsia por trepanación.
- Análisis citogenético.

Mielofibrosis «idiopática»
- Biopsia de médula ósea por trepanación.
- Determinación de ácido fólico eritrocitario.
- Ácido úrico.

Si se contempla la posibilidad de una esplenectomía:
- Estudios ferrocinéticos y de supervivencia eritrocitaria.
- Tomografía esplénica y determinación del *pool* eritrocitario.

Pancitopenia con esplenomegalia
- Aspirado de médula ósea y biopsia con trepanación.
- Cultivo bacteriano de médula ósea para tuberculosis.
- Examen de médula para descartar la presencia de amastigotes de *Leishmania donovani*.
- Biopsia de ganglios linfáticos palpables (por aspiración o quirúrgica).
- Determinaciones de vitamina B_{12} y ácido fólico.
- Biopsia hepática.
- Aspirado esplénico.

- Prueba de suero acidificado (prueba de Ham).
- Factor reumatoide sérico y panel de autoanticuerpos.
- Laparotomía y esplenectomía.
- La justificación de estas pruebas y los detalles de las exploraciones fuera de la práctica hematológica general pueden encontrarse en libros de texto de hematología, en bases de datos electrónicas y en páginas web.

CLASIFICACIÓN DE LAS NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

Desde el final de la década de los setenta, la leucemia aguda y los SMD se han definido y clasificado de acuerdo con las recomendaciones del grupo Franco-Americano-Británico (FAB). Actualmente, estas clasificaciones están siendo sustituidas por las de la Organización Mundial de la Salud (OMS), publicadas en su forma definitiva en el año 2001. Las clasificaciones de la OMS son mucho más amplias en sus objetivos e incluyen trastornos mieloproliferativos y linfoproliferativos crónicos[1,2].

La aplicación de los criterios de la OMS requiere conocer los resultados de los análisis de inmunofenotipificación y citogenéticos. Las clasificaciones de la FAB por tanto continúan teniendo un lugar: *a)* cuando estas técnicas no pueden llevarse a cabo, y *b)* en la realización de diagnósticos morfológicos provisionales mientras se espera el resultado de nuevas pruebas. Puede ser necesario realizar un informe provisional, de forma que pueda iniciarse el tratamiento, facilitándose un informe complementario más tarde de cuando todos los procedimientos diagnósticos se han completado. Es importante que, sea cual sea la clasificación utilizada, los criterios se observen estrictamente de forma que exista concordancia entre diferentes centros y países. Para evitar cualquier posibilidad de confusión, la terminología FAB (p. ej., M1, M2, etc.) no debería aplicarse si la clasificación OMS es la utilizada.

Clasificación de la leucemia mieloide aguda

Los criterios FAB para un diagnóstico de LMA (tabla 23.1) son los siguientes:

1. Los blastos deben constituir al menos el 30% de todas las células en la médula ósea, **o**
2. Cuando las células eritroides constituyen al menos el 50% de las células en la médula ósea, los blastos deben ser al menos el 30% de las células no eritroides (linfocitos, células plasmáticas, macrófagos y células cebadas también se excluyen del recuento), **o**
3. Los rasgos citológicos son característicos de la leucemia promielocítica hipergranular aguda o su forma variante, **y**
4. Los blastos demuestran ser mieloides bien porque al menos el 3% de los blastos son positivos para negro Sudán B, mieloperoxidasa o esterasa inespecífica, bien por demostración de antígenos mieloides en la inmunofenotipificación.

Tabla 23.1. Clasificación Franco-Americana-Británica (FAB) de la leucemia mieloide aguda

Categoría	Criterios
M0	<3% de blastos MPO o NSB positivo Marcadores linfoides negativos Características inmunológicas o ultraestructurales de diferenciación mieloide
M1	Blastos ≥90% del total de CNE en médula ósea ≥3% de blastos MPO o NSB positivo Componente monocítico maduro en médula ósea ≤10% Componente granulocítico maduro en médula ósea ≤10%
M2	Blastos entre el 30-89% de las CNE en MO Componente granulocítico maduro en médula ósea >10% del total de CNE Componente monocítico MO <20% de CNE y no se cumplen los otros criterios de M4
M3	Morfología característica
M4	Blastos ≥30% de CNE en MO Componente granulocítico maduro en médula ósea ≥20% Componente monocítico de CNE en médula ósea ≥20% CNE y bien monocitos en SP ≥5×10^9/l o MO como M2 pero con monocitos en SP ≥5×10^9 y pruebas citoquímicas de diferenciación monocítica
M5a	Blastos ≥30% de CNE Componente monocítico en MO ≥80% de las CNE Monoblastos ≥80% de componente monocítico en MO
M5b	Blastos ≥30% de CNE Componente monocítico en MO ≥80% de las CNE Monoblastos <80% de componente monocítico en MO
M6	Células eritroides ≥50% de células de MO Blastos en MO ≥30% de las CNE
M7	Blastos que demuestran ser predominantemente megacarioblastos

CNE, células no eritroides; MO, médula ósea; MPO, mieloperoxidasa; NSB, negro Sudán B; SP, sangre periférica.

La clasificación de la OMS categoriza un caso como LMA si se cumplen los siguientes criterios:

1. Existe al menos un 20% de blastos de línea mieloide en sangre o médula ósea, **o**
2. Si las células eritroides son al menos el 50% de las células de la médula ósea, los blastos son al menos el 20% de las células no eritroides, **o**
3. Las células eritroides primitivas constituyen al menos el 80% de las células de la médula ósea, **o**
4. Existe un sarcoma mieloide (sarcoma granulocítico), **o**

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 23.2. Clasificación de la Organización Mundial de la Salud de la leucemia mieloide aguda (LMA)

TLMA y síndrome mielodisplásico relacionado con el tratamiento[a]
Relacionadas con agentes alquilantes
Relacionadas con inhibidores de la topoisomerasa II
Otros tipos
LMA con alteraciones genéticas recurrentes[a]
LMA con t(8;21) (q22;q22)/fusión *LMA1-ETO*
LMA con eosinófilos de médula ósea anormales e inv(16)(p13q22) o t(16;16)(p13;q22)/fusión *CBFB-MYH11*
Leucemia promielocítica aguda con t(15;17)(q22;q12)/fusión *PML-RARA* y variantes
LMA con reordenamiento 11q23 y alteración de LLM
LMA con displasia multilínea[b]
Tras un síndrome mielodisplásico o un síndrome mielodisplásico/mieloproliferativo
Sin antecedentes de síndrome mielodisplásico
LMA no clasificada en otra parte
LMA mínimamente diferenciada (equivalente a la FAB M0)
LMA sin maduración (equivalente a la FAB M1)
LMA con maduración (equivalente a la FAB M2)
Leucemia mielomonocítica aguda (equivalente a la FAB M4)
Leucemia monoblástica aguda y leucemia monocítica aguda (equivalente a la FAB M5a, M5b)
Leucemia eritroide aguda
Eritroleucemia (equivalente a la FAB M6)
Leucemia eritroide pura
Leucemia megacarioblástica aguda (equivalente a la FAB M7)
Leucemia aguda a basófilos
Panmielosis aguda con mielofibrosis
Sarcoma mieloide (granulocítico o monocítico)

[a] Si los casos relacionados con el tratamiento presentan alteraciones citogenéticas, esto se debe reflejar.
[b] *Definidas* como al menos 50% de células displásicas en al menos 2 líneas.

5. Se constata cualquiera de los reordenamientos cromosómicos especificados (tabla 23.2).

En la clasificación FAB, la LMA se categoriza como se muestra en la tabla 23.1. En la clasificación OMS, la LMA se clasifica como se muestra en la tabla 23.2. Debe reseñarse que la clasificación de la OMS es jerárquica. Si es oportuno, los casos son en primer lugar asignados a la categoría de leucemia relacionada con el tratamiento. A continuación, los casos son asignados, si es adecuado, a la categoría de LMA con alteraciones genéticas recurrentes. Los casos se continúan asignando a categorías sucesivas en el orden que se muestra en la tabla 23.2, siendo los restantes casos finalmente categorizados como «LMA no clasificada en otro grupo». Este grupo final es subdividido a continuación en categorías imitando las de la clasificación FAB (pero definidas de una manera bastante diferente). El grupo de «no clasificados en otro grupo» incluye varias entidades que se han definido recientemente (panmielosis aguda con mielofibrosis y leucemia eritroide pura) o no fueron específicamente mencionadas en la clasificación FAB (leucemia aguda a basófilos y sarcoma mieloide, granulocítico o monocítico).

Clasificación de los síndromes mielodisplásicos

Los criterios FAB para el diagnóstico de los SMD son la existencia de signos de neoplasia mieloide con hematopoyesis ineficaz pero sin llegar a cumplir los criterios de LMA. Los blastos deben constituir menos del 30% de la población de la médula ósea. En la clasificación de la OMS debe haber signos de una neoplasia mieloide con hematopoyesis ineficaz y los blastos deben constituir menos del 20% tanto en sangre como en médula ósea. Además, no deben estar presentes las alteraciones citogenéticas específicas mostradas en la tabla 23.2 (de ser así, el caso se define como una LMA, independientemente del recuento de blastos). Existe una diferencia principal más entre las dos clasificaciones: específicamente que la leucemia mielomonocítica crónica es clasificada como un SMD en la clasificación FAB, mientras que en la clasificación OMS se asigna a una nueva categoría de trastorno denominado enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas. Los detalles de la clasificación FAB de los SMD se muestran en la tabla 23.3, y los de la clasificación OMS en la tabla 23.4. Se apreciará que el análisis citogenético es esencial para la aplicación de la clasificación OMS porque los casos del síndrome 5q- no pueden identificarse de otra forma. Como en el caso de la clasificación de la OMS de la LMA, ésta es una clasificación jerárquica. Los SMD relacionados con el tratamiento son categorizados como LMA relacionada con el tratamiento. Los casos restantes son a continuación evaluados para establecer si cumplen los criterios de síndrome 5q-. Si no lo hacen, son asignados a las categorías restantes, dependiendo del número de líneas que presentan displasia, el porcentaje de sideroblastos en anillo, la presencia o ausencia de

Tabla 23.3. Clasificación Franco-Americana-Británica de los síndromes mielodisplásicos

Categoría	Criterios de sangre periférica	Criterios de médula ósea
Anemia refractaria (AR) o citopenia refractaria[a]	Anemia[a], blastos ≤1%, monocitos ≤1% × 10^9/l	Blastos <5%, sideroblastos en anillo 15% de eritroblastos
Anemia refractaria con sideroblastos en anillo (RARS)	Anemia, blastos ≤1%, monocitos ≤1 × 10^9/l	Blastos <5%, sideroblastos en anillo >15% de eritroblastos
Anemia refractaria con exceso de blastos (RAEB)	Anemia, blastos >1% <5%, monocitos ≤1 × 10^9/l o blastos <5% y	blastos ≥5% <20% pero blastos <20%
Anemia refractaria con exceso de blastos en transformación (RAEB-T)	Anemia, o blastos ≤5%	Bastones de Auer en sangre o médula ósea o Blastos ≥20% pero blastos <30%
Leucemia mielomonocítica crónica (LMMC)	Monocitos >1 × 10^9/l, granulocitos frecuentemente aumentados, blastos <5%	Blastos <20%, promonocitos frecuentemente incrementados

[a] *O*, en el caso de la citopenia refractaria, o neutropenia o trombocitopenia.

Tabla 23.4. Resumen de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud del síndrome mielodisplásico (SMD)

Enfermedad	Hallazgos sanguíneos periféricos	Hallazgos en médula ósea
SMD asociado con una del(5q) aislada	Anemia, recuento plaquetario habitualmente normal o elevado, <5% blastos	Megacariocitos normales o incrementados pero con núcleos hiperlobulados, <5% blastos, no bastones de Auer
Anemia refractaria (AR)	Anemia, no blastos o infrecuentes	Displasia limitada a línea eritroide, <5% blastos, <15% de sideroblastos en anillo
Anemia refractaria con sideroblastos en anillo (RARS)	Anemia, no blastos	Displasia limitada a línea eritroide, <5% blastos, ≥15% de sideroblastos en anillo
Citopenia refractaria con displasia multilínea (RCMD)	Citopenias (bicitopenia o pancitopenia), no blastos o infrecuentes, no bastones de Auer, <1 × 10^9/l monocitos	Displasia en ≥10% de las células de dos o más líneas de células mieloides, <5% blastos, ≥15% de sideroblastos en anillo, no bastones de Auer
Citopenia refractaria con displasia multilínea y sideroblastos en anillo (RCMD-RS)	Citopenias (bicitopenia o pancitopenia), no blastos o infrecuentes, no bastones de Auer, <1 × 10^9/l monocitos	Displasia en ≥10% de las células de dos o más líneas de células mieloides, <5% blastos, ≥15% de sideroblastos en anillo, no bastones de Auer
Anemia refractaria con exceso de blastos-1 (RAEB-1)	Citopenias, <5% blastos, no bastones de Auer, <1 × 10^9/l monocitos	Displasia de una única línea o múltiples líneas, 5-9% blastos, no bastones de Auer
Anemia refractaria con exceso de blastos-2 (RAEB-2)	Citopenias, 5-19% blastos, bastones de Auer algunas veces presentes, <1 × 10^9/l monocitos	Displasia de una única línea o múltiples líneas, 10-19% blastos, bastones de Auer algunas veces presentes
Síndrome mielodisplásico inclasificable (SDM-I)	Citopenias, no blastos o infrecuentes, no bastones de Auer	Displasia de una única línea (megacariocítica o granulocítica), <5% blastos, no bastones de Auer

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 23.5. Resumen de las categorías de enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas de la Organización Mundial de la Salud

Categoría	Criterios
Leucemia mielomonocítica crónica (LMMC)	Trastorno con recuento de monocitos >1 × 10^9/l, *BCR-ABL* negativo, Ph negativo Menos de un 20% de blastos más promonocitos en sangre periférica (SP) o médula ósea (MO) O bien aparece displasia de una o más líneas mieloides o bien cumple criterios alternativos (alteraciones citogenéticas clonales adquiridas o monocitosis que persiste durante al menos 3 meses y se excluyen causas alternativas de monocitosis)
Leucemia mieloide crónica atípica (LMCa)	Trastorno con leucocitosis *BCR-ABL* negativo, Ph negativo resultado de un incremento en los neutrófilos y en sus precursores, los precursores (promielocitos a metamielocitos) constituyen al menos el 10% de las células blancas en SP Basófilos menos del 2% de los leucocitos Monocitos menos del 10% de los leucocitos Una MO hipercelular con hiperplasia y displasia granulocítica, con o sin displasia de otras líneas celulares Menos del 20% de blastos más promonocitos en sangre periférica o médula ósea
Leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ)	Trastorno con recuento de monocitos >1 × 10^9/l, *BCR-ABL* negativo, Ph negativo Menos de un 20% de blastos más promonocitos en sangre periférica (SP) o médula ósea (MO) Más dos o más de los siguientes rasgos: Incremento de la hemoglobina F para la edad Granulocitos inmaduros en SP Recuento leucocitario mayor de 10 × 10^9/l Alteraciones cromosómicas clonales (monosomía del 7 no excluida) Hipersensibilidad de los precursores mieloides al GM-CSF *in vitro*
Enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas, inclasificables	Un trastorno mielodisplásico/mieloproliferativo en el que se cumplen los criterios de uno de los síndromes mielodisplásicos Hay rasgos proliferativos prominentes (p. ej., recuento plaquetario de más de 600 × 10^9/l o un recuento de células blancas mayor de 13 × 10^9/l) El trastorno se desarrolla *de novo* No se satisfacen los criterios de otros SMD/SMP (LMMC, LMCa y LMMJ) No hay cromosoma Philadelphia, gen de fusión *BCR-ABL*, 5q-, inv(3)(q21q26) o t(3;3)(q21;q26)

bastones de Auer y el porcentaje de blastos en sangre y médula ósea. Los detalles de la clasificación de la OMS de las enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas se muestran en la tabla 23.5

Clasificación de la leucemia linfoblástica aguda

Tanto las clasificaciones de la FAB como de la OMS requieren que se demuestre de forma positiva una leucemia aguda que pertenece a línea linfoide, antes de categorizarla como leucemia linfoblástica aguda (LLA) para así evitar clasificar de forma inadvertida las LMA M0 y M7 de la FAB como LLA. Los grupos de clasificación de la OMS juntan la LLA y el linfoma linfoblástico, utilizando las denominaciones de leucemia linfoblástica/linfoma linfoblástico de precursores tipo B y leucemia linfoblástica/linfoma linfoblástico de precursores tipo T. Estas denominaciones son demasiado engorrosas para su utilización en la práctica clínica, y obviamente los hematólogos continúan utilizando el término de «leucemia linfoblástica aguda». El grupo FAB clasificó las LLA en tres categorías morfológicas, denominadas L1, L2 y L3. Tiene poca importancia si un caso pertenece a la categoría L1 o L2, y la distinción puede obviarse. Sin embargo, la morfología L3, es decir, la presencia de «blastos» con citoplasma basófilo y vacuolización, tiene considerable significado clínico. En la mayoría de estos casos, aunque no en todos, las células son inmunológicamente maduras y expresan inmunoglobulinas en la superficie de la membrana, y la enfermedad representa la presentación leucémica del linfoma de Burkitt. La clasificación de la OMS clasifica tales casos como linfomas de Burkitt. Esto es más adecuado que categorizarlos como LLA porque el tratamiento de estos casos difiere muy considerablemente del tratamiento de la LLA.

Clasificación de los trastornos mieloproliferativos

La clasificación OMS de los trastornos mieloproliferativos se resume en la tabla 23.6. La mayoría de estas enfermedades son definidas de acuerdo con la práctica hematológica

Tabla 23.6. Resumen de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud de los trastornos mieloproliferativos

Leucemia mieloide crónica, cromosoma Philadelphia positivo (t(9;22)(q34;q11), fusión *BCR-ABL*)
Leucemia neutrofílica crónica
Leucemia eosinofílica crónica/síndrome hipereosinofílico[a]
Mielofibrosis idiopática crónica
Policitemia vera
Trombocitemia esencial
Trastornos mieloproliferativos, inclasificable

[a] Los casos de síndrome hipereosinofílico se clasifican como una leucemia eosinofílica si hay más de un 2% de blastos en la sangre o más del 5% (pero menos del 20%) de blastos en la médula ósea o si las células mieloides tienen una alteración citogenética clonal u otra evidencia de clonalidad; otros ejemplos de síndrome hipereosinofílico continúan siendo clasificados como idiopáticos y no son considerados como síndromes mieloproliferativos.

establecida. Sin embargo, el método para distinguir entre una trombocitemia esencial y una mielofibrosis idiopática difiere de la práctica previa, existiendo muchos casos que previamente se habrían categorizado como trombocitemia esencial y que ahora se clasifican como fase celular de la mielofibrosis; está por ver si esta clasificación será ampliamente aceptada. La clasificación de la OMS de los trastornos mieloproliferativos tiene poco en cuenta los análisis citogenéticos o de genética molecular, y tan sólo la leucemia mieloide crónica Ph positiva se define sobre esta base. Debe reseñarse que la clasificación de la OMS define un caso con hipereosinofilia como una leucemia eosinofílica, en vez de como un síndrome hipereosinofílico idiopático, cuando hay evidencia de clonalidad. El síndrome 4q12, resultado de una deleción críptica en 4q12 con la formación de un gen de fusión *FIP1L1-PDGFRA,* es por tanto clasificado como una leucemia eosinofílica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al 2001 WHO classification of tumours: pathology and genetics of tumours of haematological and lymphoid tissues. IARC Press, Lyon, France.
2. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD 2002 The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. Blood 100:2292–2302.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

24 Organización y gestión del laboratorio

S. Mitchell Lewis y Anne Bradshaw

Estructura y función de la gestión 535
Planificación estratégica y de negocio 536
Fiabilidad de las pruebas 538
Selección de las pruebas 539
Utilidad de las pruebas 539
Instrumentación 540
Procesamiento de los datos 541
Ordenadores de laboratorio 542
Etapas preanalítica y postanalítica de las pruebas 543
Pruebas en el punto de asistencia 545
Autoprueba del paciente 546
Servicios de laboratorio para médicos generales 546
Procedimientos normalizados de trabajo 547
Auditoría y acreditación del laboratorio 547
Auditoría 547
Acreditación 547
Estándares internacionales de práctica 549
Comparativa 550

La función esencial de un laboratorio de hematología es obtener datos fiables y reproducibles para la evaluación del estado de salud del paciente y para los estudios epidemiológicos, así como proporcionar a los clínicos informes oportunos, significativos y sin ambigüedades, que sirvan de ayuda para diagnosticar la enfermedad y para monitorizar su respuesta al tratamiento. Los avances de la tecnología y el incremento en la legislación de los cuidados de la salud se han añadido a la complejidad de la práctica de laboratorio moderna, cuya área de responsabilidad debería incluir la etapa preanalítica (es decir, petición de las pruebas, extracción de sangre, transporte de las muestras, etc.), así como la etapa postanalítica (es decir, mantenimiento de un archivo de los datos, preparación de informes, transmisión de resultados, etc.). La gestión y la organización son esenciales para una buena práctica de laboratorio. Los principios esbozados en este capítulo se aplican tanto a pequeños como a grandes departamentos, aunque estos últimos necesitan unas configuraciones de la gestión más complejas.

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA GESTIÓN

La estructura de la gestión del laboratorio de hematología debe seguir una clara línea de responsabilidad desde cada miembro de la plantilla hasta el jefe de servicio. A su vez, el jefe de servicio tiene que ser el directivo responsable frente al director médico (de los laboratorios) y, después, frente al hospital o al comité ejecutivo de la autoridad sanitaria. El jefe de servicio es responsable de liderar el departamento, de asegurar que el laboratorio tiene una representación autorizada dentro del hospital, y de garantizar que las tareas administrativas y de gestión se llevan a cabo de una manera eficiente. La gestión requiere un esfuerzo integrado del equipo, contribuyendo los miembros individuales de la plantilla con sus habilidades de gestión en los aspectos especificados. Todo el personal médico y técnico superior debe recibir cierta formación en la gestión del laboratorio. Cuando el jefe de servicio delegue las tareas de gestión a otros, estas responsabilidades tienen que estar claramente definidas y establecidas.

La gestión de un departamento requiere un comité ejecutivo y, bajo este comité, responsable ante el jefe de servicio, debe haber una serie de individuos designados con la responsabilidad de poner en marcha las funciones del servicio (tabla 24.1). Claramente, las actividades de varios miembros de la plantilla se superponen, y debe haber una comunicación adecuada y efectiva entre ellos. Debe haber sesiones informativas regulares en las reuniones del jefe técnico con el personal de su sección. La única manera de evitar que se filtre información no autorizada de las comisiones que preparan las políticas es asegurar que todos los miembros de la plantilla se mantengan plenamente informados de cualquier actividad que pueda tener que ver con su carrera profesional, sus prácticas de trabajo o su bienestar.

Debido a los requerimientos establecidos por las agencias reguladoras para la acreditación de los laboratorios y auditoría de sus prestaciones (v. pág. 547), los documentos de gestión y prácticas de laboratorio de las autoridades que establecen los estándares y la plétora de guías de actuación de organismos profesionales nacionales e internacionales, puede que sea necesario crear un subcomité especial del

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 24.1. Sugerencia de componentes de una estructura de gestión

Comité ejecutivo Jefe de servicio Director financiero Especialistas en hematología Responsable científico principal
Responsable de seguridad
Responsable de control de calidad
Supervisor de los ordenadores y del procesamiento de datos
Jefes de secciones técnicas Citometría Morfología de las extensiones de sangre Inmunohematología Hemostasia Transfusión sanguínea Pruebas especiales (anemias hemolíticas, hemoglobinopatías, citoquímica, etc.) Técnicas moleculares
Supervisor administrativo

comité ejecutivo, cuya función sea la de mantenerse al corriente de estas cuestiones y la de interrelacionarse con las diferentes secciones, de la misma forma que un responsable de seguridad.

Evaluación del personal

Todos los miembros de la plantilla deben recibir formación para potenciar sus habilidades y desarrollar su carrera profesional. Esto requiere la fijación de objetivos y la realización de evaluaciones regulares del progreso, tanto en la capacidad de gestión como en la técnica. El proceso de evaluación debe surgir del jefe de servicio, y aquellos que lleven a cabo las evaluaciones en niveles sucesivos deben recibir una formación apropiada. El evaluador tiene que proporcionar una pequeña lista de temas a la persona que va a entrevistar, a quien se debe animar a completar la lista, de manera que cada uno conozca los temas que se van a tratar. No debe incluir aspectos retributivos. Una entrevista de evaluación ha de ser abierta y hacerse en forma de un diálogo constructivo acerca de la situación actual de desarrollo y los progresos hechos hasta la fecha. De manera ideal, los miembros de la plantilla deben salir de la entrevista con la certeza de que su desarrollo personal y su futuro progreso son importantes para el servicio, de que se han identificado las prioridades, de que se ha acordado un plan con hitos y con escala de tiempo, y que se va a controlar el progreso. Las entrevistas formales de evaluación (anuales para el personal de mayor categoría y más a menudo para los demás) se deben complementar con discusiones de seguimiento menos formales para controlar el progreso. La documentación de las entrevistas formales se puede limitar a una pequeña lista que enumere los objetivos acordados.

La evaluación del rendimiento puede tener un valor duradero en el desarrollo personal de los individuos, pero es fácil que el proceso se maneje mal, por lo que no se debería comenzar sin haber recibido formación adecuada sobre cómo mantener una entrevista de evaluación[1].

Desarrollo profesional continuado

El desarrollo profesional continuado, junto con una educación médica continuada, es un proceso de aprendizaje sistemático que permite a los trabajadores de la sanidad estar constantemente al día de los avances en su profesión y, por tanto, asegura su competencia profesional a lo largo de toda su carrera. En una serie de países ya se han establecido políticas y programas y, en algunos, la participación en ellos es un requisito obligatorio para tener derecho al ejercicio. Los organismos profesionales nacionales, que son responsables de los estándares de la práctica de sus miembros, desarrollan esquemas para el desarrollo profesional continuado. En el Reino Unido, el Royal College of Pahologists[2,3] suministra un protocolo relevante para los hematólogos clínicos. El Institute for Biomedical Science lleva un proyecto para los científicos y técnicos que trabajan en un laboratorio, que es obligatorio para la acreditación del laboratorio por la Clinical Pathology Accreditation (v. pág. 547); los detalles del proyecto del Institute están disponibles en su página web (www.ibms.org). El proceso de desarrollo profesional continuado se basa en la obtención de «créditos» por diversas actividades predeterminadas, como asistir a conferencias específicas, talleres o congresos, dar conferencias, escribir libros o artículos para revistas, utilizar programas basados en ordenador o en revistas, y tomar parte en los debates de las revisiones por pares. Los puntos de los créditos se acumulan para obtener una puntuación anual obligatoria.

Planificación estratégica y de negocio

El jefe de servicio es el responsable de determinar la dirección estratégica del departamento a largo plazo (por lo general, hasta 5 años). La planificación estratégica requiere el conocimiento de cualquier legislación local o nacional que pueda afectar al laboratorio, así como de los cambios en la práctica local de la clínica que puedan alterar el volumen de trabajo. De manera convencional se desarrolla un análisis de las puntos fuertes y puntos débiles del laboratorio, así como de su capacidad de responder a las amenazas y oportunidades externas (el análisis «DAFO»). La expansión de un servicio clínico importante, tal como el trasplante de órganos, o la oportunidad de competir por el servicio de laboratorio de otros hospitales y clínicas, podría suponer tanto una oportunidad externa como una amenaza para el laboratorio, según su capacidad de respuesta al consecuente aumento en el volumen de trabajo. Los puntos fuertes pueden incluir habilidades técnicas o científicas, mientras que una gran carga de trabajo que impida cualquier trabajo de desarrollo adicional podría ser una debilidad.

De forma creciente, los laboratorios deben hacer frente a desafíos financieros y a la necesidad de una mayor renta-

bilidad. Esto puede requerir una racionalización, eliminando capacidades del laboratorio que ya no se usan, evitando pruebas innecesarias y asegurando un uso más eficiente del personal cualificado y del equipamiento caro. Puede exigir también la centralización de múltiples lugares de laboratorio o, por el contrario, puede haber ventajas en el establecimiento de centros satélite para el beneficio de los pacientes y los clínicos, siempre que se pueda demostrar que son rentables.

Un plan de negocio se ocupa en primer lugar de determinar los objetivos a corto plazo, que permitirán que la estrategia se ponga en marcha a lo largo del siguiente año financiero, más o menos. Es necesaria una predicción del futuro nivel de trabajo y de la expansión. La planificación de estos objetivos debe incluir a toda la plantilla, porque así se aumentará la conciencia de todos los problemas y se desarrollará la «propiedad» de la estrategia. En todos los laboratorios, excepto en los más pequeños, se necesita un director de negocio, para coordinar dicha planificación y para servir de unión con los directores de negocio equivalentes en otras áreas clínicas y de laboratorio. La planificación del negocio también necesita un sofisticado proceso de contabilidad del laboratorio con un registro actualizado del volumen de trabajo y los costes, de manera que se pueda establecer el precio real de las pruebas.

Valoración del volumen de trabajo y del coste de las pruebas

Los laboratorios deben mantener registros precisos del volumen de trabajo y de los costes, con el fin de adjudicar recursos a cada sección. La informatización de los laboratorios ha facilitado en gran medida este proceso. Para valorar la carga de trabajo, se debe contabilizar el ciclo completo, desde la recepción de la muestra hasta la emisión de un informe, si la prueba se hace con un método manual o semiautomático o por analizadores automatizados de múltiples analitos de gran volumen, el papel de los científicos biomédicos/técnicos de mayor categoría y técnicos principiantes, ayudantes de laboratorio supervisados, personal administrativo y personal médico responsable de revisar el informe. Las horas extra de trabajo requieren un cálculo diferente de los costes.

Los métodos para determinar la carga de trabajo de las secciones de laboratorio de manera individual, ajustada según la complejidad de las pruebas, se describen en las Guidelines of the Canadian Health Service Organizations[4]. El College of American Pahologists[5] y el sistema Welcan del Reino Unido[6] han publicado sistemas de puntuación de cargas de trabajo similares. Sin embargo, en la mayoría de las áreas esto ha sido ampliamente reemplazado por la comparativa *(benchmarking)* (v. pág. 548).

Control financiero

El coste total de las pruebas incluye todos los aspectos de la función del laboratorio (tabla 24.2). La cantidad destinada para el salario de la plantilla debe incluir los costes de formación y debería tener en cuenta las ausencias por permisos anuales o por enfermedad. También es necesario tener en cuenta el grado de implicación de la plantilla de diversos niveles, como se describe previamente. Los costes indirectos se pueden repartir entre diferentes secciones del servicio que compartan costes fijos comunes.

Tabla 24.2. Factores que contribuyen al coste de las pruebas de laboratorio

Costes directos
Salarios de la plantilla
Compra de equipos de laboratorio
Reactivos y otros fungibles
Mantenimiento del equipo
Control de calidad
Formación técnica específica de los equipos
Costes indirectos
Costes del capital y la hipoteca
Depreciación
Reparaciones en el edificio y mantenimiento de rutina
Luz, calefacción y eliminación de residuos
Servicios personales
Servicios de limpieza
Transporte y celadores
Servicios de lavandería
Ordenadores
Teléfono y fax
Franqueo de cartas

Cálculo de los costes de las pruebas

Cuando se prepara un presupuesto, la siguiente fórmula proporciona una estimación razonablemente fiable de los costes anuales totales:

$$[L \times N] + [C \times N] + E + M + G + S + T + A, \text{ donde}$$

L = Costes laborales de cada prueba a partir de la estimación del tiempo empleado y de la proporción del salario del miembro/s de la plantilla que llevan a cabo las pruebas.
N = Número de pruebas anuales.
C = Coste de fungibles por prueba (incluyendo los controles).
E = Costes anuales de los equipos, basado en el coste inicial dividido por la vida esperada del equipo[a].
M = Mantenimiento anual y revisiones del equipo.
G = Gastos fijos del laboratorio (v. tabla 24.2).
S = Supervisión.

[a] Tanto una proporción del coste original como el coste anual de alquiler, como se discute más adelante.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

T = Transporte y comunicación.
A = Administración del laboratorio, incluyendo los salarios del personal administrativo y no técnico.

Un presupuesto eficiente requiere un control regular, al menos una vez al mes. Las hojas de cálculo de los ordenadores son una buena forma de tener fácilmente una visión completa del estado de las finanzas y del resultado posible.

En general, los costes de la plantilla son, con diferencia, el mayor componente de los costes totales del funcionamiento de un laboratorio. Además, la mayoría del resto de los costes son obligaciones fuera del control directo del laboratorio. Si se hace necesario un ahorro financiero, éste se puede lograr de diversas maneras, aunque, normalmente, para conseguir un gran ahorro se necesita una reducción en la plantilla, ya que los costes laborales pueden suponer las tres cuartas partes del gasto total. Algunas posibles iniciativas serían las siguientes:

- Racionalización del servicio con otros hospitales locales, para evitar duplicidades.
- Reestructuración dentro del laboratorio del hospital, para el trabajo de especialidades interdisciplinarias (p. ej., entre hematología y química clínica).
- Subcontratación de las pruebas muy específicas a otros hospitales especializados.
- Empleo de personal a tiempo parcial (p. ej., para el servicio de urgencias nocturno o de fin de semana o para el servicio de flebotomía) y compartir el servicio de urgencias entre varios hospitales locales.
- Revisar los precios según la carga de trabajo y el coste calculado por prueba.

Un uso cada vez mayor de sistemas automatizados permitirá la reducción de la plantilla[7], aunque el cálculo del ahorro debe tener en cuenta los costes de capital y de funcionamiento de los equipos, especialmente el gran coste de algunos reactivos, y si el sistema se puede usar a gran capacidad y durante un servicio de 24 h.

La compra de equipos caros al contado se añade al activo de capital del laboratorio, con el consiguiente coste de depreciación (normalmente, 8-10% al año). Alquilar el equipo puede ser una alternativa mejor, y en algunos países, la mayoría del equipo se obtiene de esta manera. Es necesario hacer un cálculo minucioso del coste del alquiler, ya que éste puede ser hasta un 20% superior al de la compra final. Una ventaja del alquiler es la flexibilidad para modernizar el equipo, de manera que se puede aumentar la carga de trabajo y cambiar la tecnología. Si los costes de mantenimiento y fungibles se incluyen en el acuerdo, es importante ni sobrestimar ni subestimar los requerimientos anuales que se incluirán en el contrato.

Cuando la automatización se une con la centralización del servicio en otro lugar, hay que tener cuidado de mantener la calidad del servicio. Si se fracasa en esto, se fomenta a los clínicos a establecer laboratorios satélite independientes. La pérdida de contacto entre los usuarios clínicos y el personal del laboratorio puede comprometer la fase preanalítica del proceso de las pruebas, y puede llevar a peticiones inapropiadas, peticiones excesivas y muestras para pruebas con un volumen inadecuado o pobremente identificadas. Cuando se centralizan los servicios, hay que prestar atención a todas las fases del proceso de la prueba (preanalítica, analítica y postanalítica), incluyendo la necesidad de embalaje de las muestras y el coste de su transporte al laboratorio.

FIABILIDAD DE LAS PRUEBAS

La fiabilidad de una prueba cuantitativa se define en términos de *incertidumbre de medición* del analito (algunas veces referido en los documentos como «mensurando»). Se basa en su exactitud y su precisión[8].

La *exactitud* es la proximidad de concordancia entre el valor obtenido con la medición y el valor real; la ampliación de la discrepancia es el *error sistemático* o *sesgo*. Las causas más importantes de error sistemático se enumeran en la tabla 24.3. El error se puede eliminar o, al menos, reducir en gran medida, mediante el uso de un estándar de referencia con la prueba, junto con un control interno de calidad y una comprobación regular mediante una valoración externa de la calidad (v. pág. 569)

La *precisión* es la proximidad a la concordancia cuando una prueba se repite un número de veces. La imprecisión es el resultado de errores aleatorios; se expresa como la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV%). Cuando los datos siguen una distribución normal (distribución de Gauss), para fines clínicos, hay un 95% de probabilidad de que los resultados que se encuentran dentro del rango de +2 DE a −2 DE del valor objetivo sean correctos.

Algunos de los demás factores enumerados en la tabla 24.3 se pueden cuantificar calculando la incertidumbre combinada de la medición. Así, por ejemplo, cuando se usa una preparación de calibración, su incertidumbre se establece según la indicación o el certificado que la acompaña. La imprecisión del estándar se calcula de la siguiente manera:

$$\sqrt{(DE_1)^2 + (DE_2)^2}$$

La *imprecisión de la medición ampliada*[8,9] tiene en cuenta los artículos no cuantificables, mediante la multiplicación de la cantidad previa por un «factor de cobertura» (k), que se considera que es, por lo general, el intervalo de confianza al 95% × 2.

Puede ser necesario decidir mediante análisis estadísticos si dos series de datos difieren significativamente. La prueba-t se usa para valorar la posibilidad de una diferencia estadística a distintos niveles de probabilidad, mediante la comparación de las medias o de los resultados apareados individualmente. La ratio F es útil para valorar la influencia de los errores aleatorios en dos series de resultados de pruebas.

Tabla 24.3. Errores sistemáticos en los análisis
Calibración incierta del analizador (no se dispone de estándares de referencia)
Sesgos en los instrumentos, el equipo o el material de laboratorio hecho de cristal
Dilución incorrecta
Fallos en los pasos de las mediciones (p. ej., reactivos, espectrometría, cálculos, etc.)
Muestreo no representativo de la muestra
Muestras no representativas del estatus *in vivo*
Definición incompleta del analito o falta de resolución crítica del analizador
Aproximaciones y supuestos arbitrarios inherentes a la función del analizador
Efectos del ambiente sobre el analizador
Deterioro preanalítico de las muestras

SELECCIÓN DE LAS PRUEBAS

Para valorar la fiabilidad diagnóstica y el valor predictivo de una prueba de laboratorio concreta, es necesario calcular la sensibilidad y la especificidad de la prueba[10]. La *sensibilidad* es la fracción de resultados positivos verdaderos cuando se aplica a pacientes que se sabe que tienen la enfermedad en cuestión, o cuando los resultados se han obtenido con el método de referencia. La *especificidad* es la fracción de resultados negativos verdaderos cuando la prueba se aplica a personas sin esa enfermedad.

Sensibilidad diagnóstica= VP ÷ (VP + FN)
Especificidad diagnóstica= VP ÷ (VP + FN)
Valor predictivo positivo= VP ÷ (VP + FP)
Valor predictivo negativo= VN ÷ (VN + FN)

donde VP = verdaderos positivos; VN = verdaderos negativos; FP = falsos positivos; FN = falsos negativos.

La fiabilidad global se puede calcular como:

$$\frac{\text{VP + VN}}{\text{N.° total de pruebas}} \times 100\%$$

La sensibilidad y la especificidad deben ser cercanas a 1,0 (100%) si la prueba es única para ese diagnóstico en concreto. Un grado menor de sensibilidad y especificidad pueden ser aún aceptables si los resultados se interpretan junto con otras pruebas, como parte de un patrón global. Por lo general, no es posible tener a la vez un 100% de especificidad y un 100% de sensibilidad. Según el propósito particular de la prueba, será más importante la sensibilidad o la especificidad. Así, por ejemplo, si es necesaria la hemoglobinometría en la clínica, para identificar a pacientes con anemia, la sensibilidad es importante, mientras que en la selección de donantes de sangre, la especificidad es más importante para seleccionar individuos que no sean anémicos.

Ratio de verosimilitud

La proporción de resultados positivos de la enfermedad, en relación con la frecuencia de resultados falsos positivos en sujetos sin enfermedad, nos da una medida estadística de discriminación de la prueba entre enfermedad y no enfermedad. Se puede calcular de la siguiente manera:

Sensibilidad / 1 – Especificidad[11]

Cuanto mayor sea esta ratio, mayor será la probabilidad de la enfermedad, mientras que un ratio <1 hace que la probabilidad de que la enfermedad se diagnostique correctamente mediante la prueba sea mucho menor. En cambio, la verosimilitud de normalidad se puede calcular como (1 – sensibilidad) / especificidad.

Un método alternativo es el de Youden, que se obtiene calculando la especificidad / (1 – sensibilidad)[12]. Los valores oscilan entre –1 y +1. Con un aumento de la ratio positiva por encima de cero hacia +1, hay una probabilidad creciente de que la prueba discrimine la presencia de esa determinada enfermedad, y hay una verosimilitud decreciente de que la prueba sea válida cuando la ratio caiga desde 0 hasta –1.

Análisis de las características operativas del receptor

La utilidad relativa de los diferentes métodos para la misma prueba, o de un nuevo método frente a un método de referencia, se puede valorar también mediante las características operativas del receptor (ROC)[11]. Esto se demuestra gráficamente si se traza la *sensibilidad* en el eje vertical frente a *1 – especificidad* en el eje horizontal de una serie de puntos de corte para los diferentes métodos que se desea comparar. Un resultado en la parte superior izquierda de la gráfica indica una alta sensibilidad y especificidad, y un trazado por debajo y a la izquierda de otro trazado muestra una mayor fiabilidad de ese método.

Utilidad de las pruebas

Para asegurar la rentabilidad de un servicio de laboratorio, las pruebas que no tengan un valor demostrado se tienen que eliminar, y se deben introducir nuevas pruebas que tengan una evidencia independiente de su eficacia. Existe todavía un debate sin resolver acerca de los aspectos económicos de proporcionar un programa automatizado de detección total en comparación con las pruebas seleccionadas específicamente. Sin duda, sólo unos pocos clínicos están familiarizados con los 11 (o posiblemente más) parámetros del hemograma de que informan de manera sistemática algunos analizadores automáticos. Un estudio indicó, por ejemplo, que el recuento diferencial de leucocitos se utiliza en exceso, y sólo en algunas ocasiones es útil en la clínica[13].

Para valorar la rentabilidad de una prueba, hay que tener en cuenta: *a)* el coste por prueba, comparado con otras pruebas que proporcionan información clínica similar; *b)* la fia-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

bilidad diagnóstica, y *c)* la utilidad clínica valorada como el grado en el que se depende de la prueba para las decisiones diagnósticas, si es probable que los resultados cambien la opinión diagnóstica del médico y el tratamiento clínico del paciente, teniendo en cuenta la prevalencia de la enfermedad y la situación clínica o de salud pública específica[14]. Esto requiere una auditoría llevada a cabo por un asesor independiente, para juzgar qué proporción de peticiones de una prueba en particular se usan de manera inteligente, y qué porcentaje son pruebas innecesarias o malgastadas[14,15] (v. pág. 576). La información acerca de la utilidad de varias pruebas también se puede obtener de las guías publicadas y de la comparativa (v. pág. 549).

Se puede valorar una rentabilidad realista de cualquier prueba mediante:

$$\frac{A}{B \times C}$$

donde A = coste/prueba, como se describe en la página 537, B = fiabilidad diagnóstica, como se describe en la página 539, C = utilidad clínica, como se describe previamente.

INSTRUMENTACIÓN

Evaluación del equipo

La evaluación del equipo para encajar la naturaleza con el volumen de la carga de trabajo del laboratorio es un ejercicio muy importante. El International Council for Standardization in Haematology ha publicado protocolos para evaluar los analizadores de células sanguíneas y otros instrumentos de hematología[16]. Lo siguiente se incluye de manera habitual en dichas evaluaciones:

1. Verificación de los requerimientos de los instrumentos de espacio y servicios.
2. Grado de formación técnica requerido para manejar el instrumento.
3. Claridad y utilidad del manual de instrucciones.
4. Valoración de la seguridad (mecánica, eléctrica, microbiológica y química).
5. Determinación de lo siguiente:
   a) Linealidad.
   b) Precisión/imprecisión.
   c) Acumulación.
   d) Grado de inexactitud, mediante la comparación con las mediciones mediante métodos definitivos o de referencia.
   e) Capacidad de comparación con un método establecido utilizado en el laboratorio.
   f) Sensibilidad (es decir, la determinación del cambio más pequeño en la concentración de analitos que dé un resultado medible).
   g) Especificidad (es decir, grado de error originado por sustancias que interfieren).
6. Tiempo de rendimiento y número de muestras que se pueden procesar en un día de trabajo normal.
7. Coste por prueba.
8. Fiabilidad del instrumento en un uso rutinario y adecuación del servicio y del mantenimiento ofrecidos.
9. Aceptabilidad de la plantilla, impacto en la organización del laboratorio y nivel de habilidad técnica requerida para manejar el instrumento.

Por norma, este tipo de evaluaciones son llevadas a cabo por un laboratorio de referencia, en nombre de la organización nacional de consumidores o de una agencia de salud del gobierno, como la Medical Devices Agency[b] del Department of Health de Londres, la cual relaciona una gran serie de dichos informes en su catálogo (v. www.medical-devices.gov.uk). Una marca CE en un aparato indica que cumple con las especificaciones definidas en la directiva para dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro* (v. pág. 554).

Tras la compra e instalación de un instrumento, es útil, a menudo, realizar una inspección menos amplia del rendimiento respecto a la precisión, la linealidad, la acumulación y la capacidad de comparación:

Precisión

Realizar las mediciones correspondientes 10 veces consecutivas, de tres o más muestras seleccionadas en un rango patológico, de manera que incluyan una concentración de analitos baja, alta y normal. Calcular la DE y el CV duplicados, como se muestra en la página 594.

El grado de precisión que se considera aceptable depende del propósito de la prueba (tabla 24.4). Para comprobar la precisión entre lotes, hay que medir tres muestras en varios lotes sucesivos de pruebas de rutina; calcular la DE y el CV de la misma forma.

Linealidad

La linealidad demuestra los efectos de la dilución. Preparar una muestra con una alta concentración del analito para analizar y, de manera tan precisa como sea posible, hacer series de diluciones en plasma, de manera que se obtengan 10 muestras con niveles de concentraciones espaciadas a intervalos regulares entre 10% y el 100%. Medir cada muestra tres veces y calcular las medias. Trazar los resultados en un papel milimetrado aritmético. De manera ideal, todos los puntos deben caer en una línea recta que pase a través del cero de los ejes horizontal y vertical. En la práctica, los resultados deben caer dentro de los límites de 2 DE de las medias calculadas a partir de los CV, que se han obtenido mediante los análisis de precisión (v. más arriba). Una inspección del gráfico mostrará si existe linealidad a lo largo de todo el rango, o si ésta está limitada a una parte de dicho rango.

Acumulación

La acumulación indica el grado en el que es probable que se afecte la determinación de un analito de una muestra por la muestra anterior. Medir una muestra con una alta concentración por triplicado e, inmediatamente después, hacer la determinación de una muestra con una concentración baja de analito.

[b] Medicines and Healthcare-products Regulatory Agency (MHRA).

Tabla 24.4. Precisión de las pruebas según su propósito

	CV% esperado (contadores automatizados)		
Propósito de la prueba	**Hb**	**RE**	**RL**
Estándar científico	<1	1	1–2
El mayor grado de desarrollo:			
mejor desempeño	1,5	2	3
sistemática del laboratorio	2–3	3	5–6
Necesidades clínicas	5–10	5	10–15

CV, coeficiente de varianza; Hb, concentración de hemoglobina; RE, recuento de eritrocitos; RL, recuento de leucocitos.

$$\text{Acumulación (\%)} = \frac{l_1 - l_3}{h_3 - l_3} \times 100$$

donde l_1 y l_3 son los resultados de la primera y la tercera medición de las muestras con una baja concentración, y h_3 es la tercera medición de la muestra con una alta concentración.

Exactitud y capacidad de comparación

La exactitud y la capacidad de comparación prueban si el nuevo instrumento (o método) da resultados que concuerden satisfactoriamente con los obtenidos con un procedimiento establecido y con un método de referencia. Las muestras de prueba se deben medir alternativamente, o por lotes, por los dos procedimientos. Si los resultados por los dos métodos se analizan mediante el coeficiente de correlación (r), una alta correlación no significa que los dos métodos concuerden. El coeficiente de correlación es una medida de relación y no de concordancia. Es mejor utilizar los límites del método de concordancia[17]. Para esto, se trazan las diferencias entre los pares de resultados en el eje vertical de un papel milimetrado lineal frente a las medias de los pares en el eje horizontal (fig. 24.1); las diferencias entre los métodos se hacen aparentes fácilmente en el rango desde los valores bajos hasta los altos. Si la dispersión de las diferencias aumenta a valores altos, se deben trazar los datos transformados a logaritmos.

También es útil comprobar el sesgo mediante la inclusión del instrumento o del método que se está probando cuando el laboratorio participa en un protocolo externo de valoración de la calidad (v. pág. 576). El sesgo se expresa como:

$$\frac{R - M}{M} \times 100$$

donde R = medida por el aparato/método a prueba y M = resultado EQAS objetivo.

Un método alternativo para valorar el sesgo es el índice de variación[18]. Utiliza un *coeficiente de variación elegido (CVE),* que se basa en un CV óptimo para un método fiable, y el índice de variación elegido (IV%) se calcula según:

$$\frac{R - M}{M} \times \frac{100}{CVE} \times 100$$

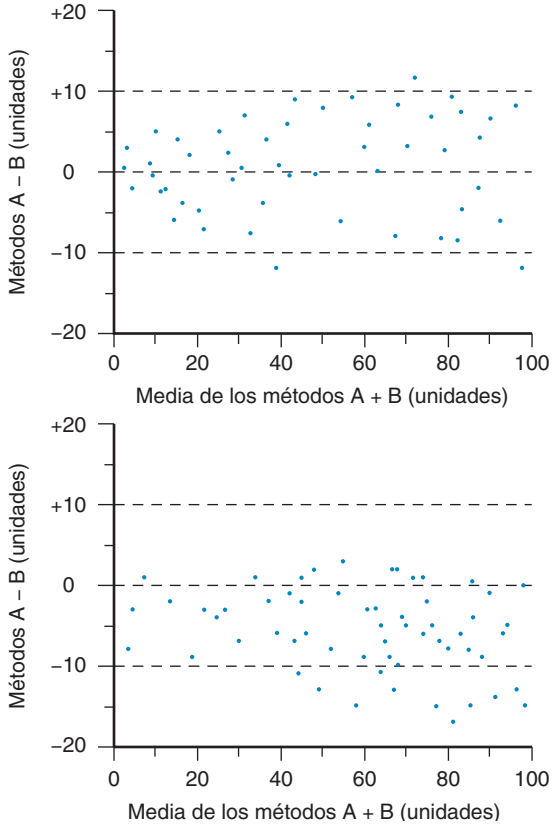


Figura 24.1. Método de los límites del acuerdo. Se muestran los valores medios de los pares de resultados obtenidos por dos métodos A más B *(eje horizontal)* trazados frente a la diferencia entre los pares de resultados *(A menos B) (eje vertical).* Las líneas horizontales representan la igualdad con un rango de ±10 unidades (media ± DE). La figura superior no muestra ningún sesgo entre el método A y el B, mientras que la figura inferior muestra resultados elevados falsos (valores negativos) para el método B.

Registros de mantenimiento

Todo el equipo del laboratorio se debe inspeccionar regularmente, y hay que llevar a cabo procedimientos de mantenimiento específicos. Cada artículo del laboratorio tiene que tener un registro de mantenimiento que documente qué mantenimiento se necesita, la frecuencia deseable y cuándo se realizó la última. El registro incluye los servicios y reparaciones del fabricante. El equipo utilizado para analizar muestras biológicas se debe limpiar a fondo antes de que se realice el procedimiento de mantenimiento, para reducir el riesgo biológico. El procedimiento para dicha limpieza tiene que estar documentado (como un procedimiento normalizado de trabajo), junto con el nombre del trabajador responsable y la fecha.

PROCESAMIENTO DE LOS DATOS

Es esencial mantener registros precisos de los resultados del laboratorio durante el período que estipule la ley nacional. El manejo de los datos asistido por ordenador es

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

esencial para todos los laboratorios, excepto para los más pequeños. Para almacenar los datos a largo plazo, existe la posibilidad de recurrir a una copia impresa, un disquete, un disco compacto o un disco Zip, o bien de usar un servidor local. Los resultados del laboratorio por lo general se publican como datos numéricos con los resultados alterados resaltados para los médicos. Las hojas de los informes deben poder leerse de forma sencilla. Las series de datos son particularmente útiles para ilustrar cualquier tendencia temporal y pueden aparecer en forma de tablas acumuladas o como gráficos. En este último caso se debe usar una escala aritmética para la hemoglobina, el recuento de eritrocitos y los reticulocitos, mientras que el recuento de plaquetas y leucocitos se muestra mejor en una escala logarítmica (fig. 24.2). Los gráficos son particularmente útiles para mostrar los resultados en relación con los intervalos objetivo, ya que eso facilita el ajuste de la dosis de los fármacos que es probable que afecten a la sangre. Además, este método de archivo reduce el número de páginas de informes de laboratorio en la historia del paciente[19,20].

Ordenadores de laboratorio

El desarrollo de la tecnología de los ordenadores ha hecho que se disponga de potentes microordenadores y sofisticados programas para ordenador a unos precios asequibles. Estos ordenadores pueden ser parte integral de un aparato analítico o estar en contacto con él a través de un cable. Se necesita un módem para unirlo al teléfono o la banda ancha para acceder a Internet y al correo electrónico, y también para interconectarse con la red de área local, de manera que se propicie el intercambio de datos y que múltiples trabajadores sean capaces de utilizar una base de datos común.

Los ordenadores se desarrollan a tal velocidad que es necesario solicitar consejo experto para asegurarse de que el material que se va a comprar tiene una adecuada capacidad de *memoria de acceso aleatorio (RAM)* y otras especificaciones para llevar a cabo los programas planeados (tabla 24.5).

En el *ABC of Medical Computing (ABC de la informática médica)* de Lee y Millman[21] se dan consejos útiles acerca del uso de los ordenadores personales, y también hay monográficos que tratan específicamente de las aplicaciones de Internet para las profesiones sanitarias[22].

Internet permite el acceso a una vasta cantidad de información. Medline y otras bibliotecas ofrecen citas y resúmenes de las revistas de casi todas las publicaciones médicas del mundo; algunas revistas proporcionan los artículos completos, que se pueden leer directamente en el ordenador o imprimirlos como archivo pdf. Esto requiere, por lo general, una tasa de inscripción, pero gracias a un acuerdo entre la Organización Mundial de la Salud (OMS) y los

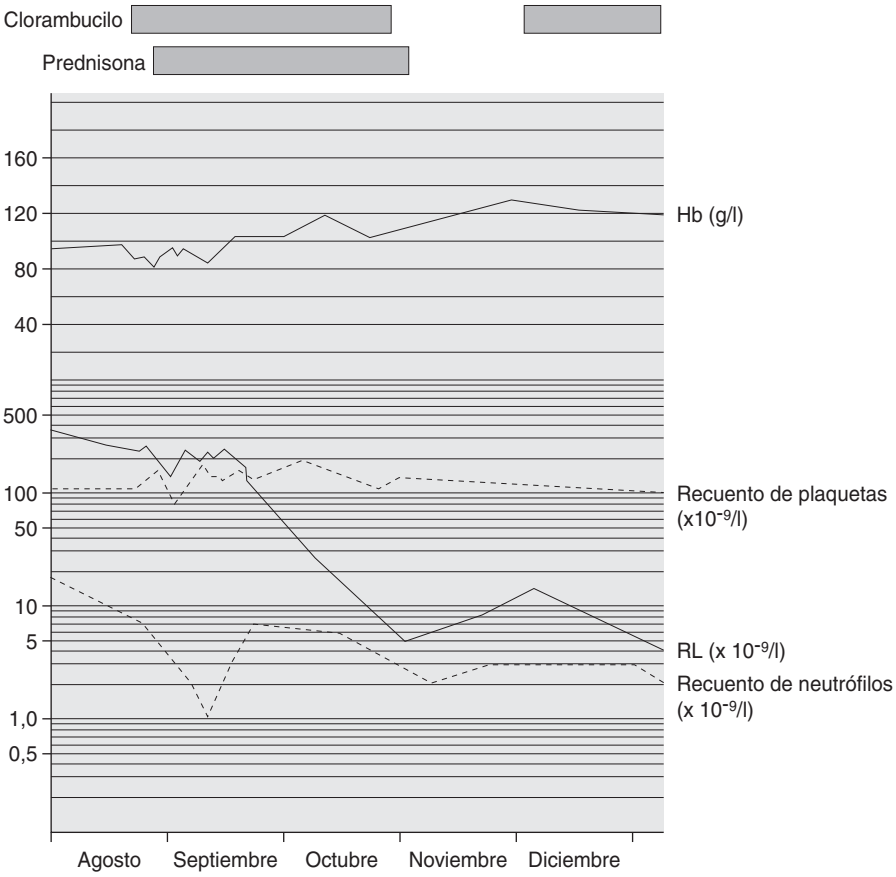


Figura 24.2. Gráfico hematológico para trazar los datos del recuento sanguíneo en un gráfico en relación con el tiempo. Se ilustra la evolución en un paciente con leucemia linfocítica crónica. La hemoglobina se registra de forma aritmética; los demás componentes están en escala logarítmica. Si se incluyen los reticulocitos, se deben registrar aritméticamente. RL: recuento de leucocitos.

Tabla 24.5. Algunos usos de los ordenadores personales del laboratorio
Estadísticas
Gráficos
Procesamiento de textos
Creación de diapositivas para conferencias
Publicación asistida por ordenador
Archivos de la base de datos
Hojas de cálculo
Registros de la carga de trabajo
Costes de las pruebas y facturación
Presupuestos de gestión
Control de los productos en existencia
Procedimientos de control de calidad
Sistemas de auditoría
Información de Internet
Correo electrónico
Material para la enseñanza/formación, incluyendo la morfología
Apoyo a la decisión clínica por sistemas expertos

editores más importantes del mundo, el acceso está disponible sin cargo o a unos precios muy reducidos en más de 100 países de bajos ingresos.

Algunos buscadores dan una traducción automática de los artículos que no están escritos en inglés.

Muchos expertos individuales tienen sus propias páginas web para presentar disertaciones y comentarios de sus especialidades, mientras que los fabricantes proporcionan información actualizada de sus productos. Es imposible hacer un índice extenso de todas las páginas web relevantes; no obstante, en la tabla 24.6 se enumeran algunas que tienen un particular interés para el laboratorio de hematología. En cualquier caso, si se introduce una palabra o frase clave, es probable que aparezcan accesos a una gran cantidad de información de virtualmente cualquier tema, así como conexiones a los temas relacionados.

ETAPAS PREANALÍTICA Y POSTANALÍTICA DE LAS PRUEBAS

El laboratorio de hematología debe estar implicado en la etapa preanalítica (solicitud de la prueba, extracción de la muestra de sangre y transporte al laboratorio), así como en la etapa postanalítica (devolución de los resultados al médico). Ambas etapas tienen un impacto significativo en la fiabilidad de la prueba, el rendimiento del laboratorio y la satisfacción del cliente[23].

Solicitud de la prueba

Hay una considerable variación entre los clínicos en sus patrones de solicitud de pruebas, y el personal del laboratorio ha ejercido, históricamente, una influencia muy pequeña en estos patrones de solicitud de pruebas, aunque los programas de educación continuada han logrado a veces unas pruebas más selectivas[24]. Las solicitudes inadecuadas son a menudo el resultado de formularios de solicitud inadecuados, como aquellos que permiten a los clínicos marcar en una lista en lugar de solicitar pruebas específicas. Las innovaciones para modificar los patrones de solicitud incluyen los formularios de solicitud orientados al problema[25] y la solicitud de las pruebas asistida por ordenador, de acuerdo con los protocolos redactados por equipos de especialistas clínicos[26].

Extracción de la muestra y transporte

Es importante tener una identificación correcta del paciente y de la muestra. Un fallo en este sentido es una causa seria de error, especialmente en la transfusión sanguínea (v. pág. 414), pero también en las pruebas sistemáticas de diagnóstico, donde la identificación de la muestra del paciente y entre las distintas muestras debe comprobarse continuamente. Se han desarrollado métodos[c] para solicitar las pruebas electrónicamente, utilizando el código de barras de identificación del paciente del hospital para comprobar la identidad del paciente en el momento de la flebotomía, imprimiendo el código de barras en los contenedores de las muestras, y comprobándolas por medio de un escáner portátil en todas las etapas del laboratorio hasta que el informe se emita[27].

Tras la extracción de la sangre, hay que hacer todo tipo de esfuerzos para que la muestra llegue al laboratorio con el menor retraso posible. Si esto no está coordinado, las muestras pueden permanecer en las áreas clínicas, esperando a ser recogidas por los transportistas, que siguen un recorrido definido por otras áreas del hospital hasta que, finalmente, llegan al laboratorio. Sin embargo, si la responsabilidad de la extracción de sangre y su transporte es del laboratorio, estas actividades separadas se pueden coordinar. Los sistemas de raíles o el transportador por tubos neumáticos se incluyen entre los métodos existentes, alternativos y más rápidos, para entregar las muestras al laboratorio[28].

Fase preanalítica

Hay que registrar la hora de la recepción y examinar las muestras, para confirmar que son apropiadas para las pruebas solicitadas y que no hay contaminación por fugas en la parte exterior de los tubos ni en los formularios de solicitud. Se deben registrar las solicitudes y separar las muestras entre «ordinarias» y «urgentes» y enviar estas últimas directamente a los miembros del personal adecuados.

[c] Por ejemplo, el sistema BD Dx.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 24.6. Páginas seleccionadas de Internet de interés en hematología

scholar.google.com>ICSH	Acceso a una amplia bibliografía de temas médicos y científicos; el vínculo ICSH enumera publicaciones del International Council for Standardization in Haematology (Consejo Internacional para la Estandarización en Hematología)
www.who.int/entity/en/	Página de inicio de la Organización Mundial de la Salud; *Essential health technology*: guía de la práctica de laboratorio; *Blood transfusion safety:* información acerca de los aparatos de transfusión sanguínea y seguridad. Enumera publicaciones de la OMS para descargar
www.ish-world.org	ICSH, con un listado de todas sus publicaciones
www.ish-world.org	Página de inicio de la International Society of Haematology
www.ifbls.org	International Federation of Biomedical Laborarory Science; organiza congresos internacionales y tiene recursos de formación
www.isth.org	International Society of Thrombosis and Haemostasis; incluye bibliografía e informes completos de comunicados oficiales de sus comités científicos y de estandarización
www.isbt-web.org	Página de inicio de la International Society of Blood Transfusion
www.rcpath.org.uk	Información general del Royal College of Pathologists del Reino Unido
www.ibms.org	Información general del Institute of Biomedical Science, incluyendo varios aspectos del CPD
www.ukneqas.org.uk	Página de inicio del UKNEQAS; hacer clic en hematología para obtener información de diversas pruebas incluidas en sus estudios
www.cpa-uk.co.uk	Clinical Pathology Accreditation del Reino Unido, con detalles de sus funciones y los procedimientos para la solicitud de acreditación por parte de un laboratorio
www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/	National Library of Medicine con acceso a Medline
www.haem.net	Revista electrónica publicada por el servicio de hematología del hospital Hammersmith; incluye información sobre la gestión del laboratorio
www.bloodmed.org/home (publicación de suscripción de Blackwell Publishing)	Revista electrónica para la investigación en hematología, práctica y formación, incluyendo artículos de revisión, guías y noticias en asuntos de regulación
www.mhra.gov.uk	Informes de la MDA acerca de la evaluación de instrumentos y equipos
www.bcshguidelines.com	Página de inicio del British Committee for Standards in Haematology, que proporciona textos completos de todas las guías actuales y pasadas, publicadas en libros o en formato revista
www.transfusionguidelines.org.uk/uk_guidelines/	Documentos de guía del Reino Unido para la transfusión sanguínea y el trasplante de tejidos
www.rph.wa.gov.au/labs/haem/malaria/index.html	Programa de formación sobre la malaria del hospital Royal Perth, Australia
www.westgard.com	*Lesson of the Month* («Lección del mes») de J. O. Westgard y otros seminarios sobre la garantía de la seguridad

Fase postanalítica

Tras llevar a cabo las pruebas, se necesitan los siguientes procedimientos para asegurar la capacidad de la etapa postanalítica:

1. Procesamiento de los resultados para transcribirlos a los formularios de informes.
2. Escrutinio inmediato de los resultados urgentes, con la publicación de un informe provisional y el reparto al clínico que lo solicitó.
3. Valoración del significado de los resultados en el contexto de los valores de referencia establecidos y decisión de hacer más pruebas.
4. Envío del informe final sin retrasos injustificados al lugar indicado en el formulario de solicitud. La información de los resultados por vía informática a monitores conectados y a impresoras localizadas en áreas clínicas es muy útil, pero en algunos países la mayoría de los hospitales confían en el transporte manual de las hojas de resultados, pudiendo prolongarse de esta forma significativamente los tiempos de finalización de las solicitudes. También se pueden utilizar los sistemas de transporte de tubos neumáticos y los raíles empleados en la etapa preanalítica para devolver rápidamente los resultados a las salas y a los clínicos. Devolver los resultados no garantiza, por supuesto, que las áreas o el personal clínico

vayan a reaccionar de manera oportuna para modificar el tratamiento del paciente o que incluso archiven el informe en la historia médica del paciente.

Es responsabilidad del clínico asegurarse de que los informes de las pruebas que ellos han solicitado se reciben y se anotan, y de que se actúa en consecuencia. Sin embargo, una buena práctica de laboratorio incluye una notificación rápida de un resultado que muestre una alteración aparentemente grave e inesperada al personal clínico responsable.

5. A modo de auditoría de la utilidad del laboratorio, debería haber contacto regular con los usuarios, para asegurarse de que los informes llegan a su debido tiempo para optimizar su uso durante el tratamiento clínico, de que los clínicos están satisfechos y de que los resultados se presentan de una manera clara y sin ambigüedades; también se debe debatir acerca de la selección de las pruebas, teniendo en cuenta la relevancia clínica de ciertas pruebas que se están llevando a cabo, la introducción de nuevas pruebas y la evaluación de los beneficios frente a los costes, como se comentó previamente.

Tiempo de respuesta tras la solicitud de la prueba

Hay una presión creciente por parte de los clínicos para obtener un informe rápido de las pruebas. La mejora del tiempo de respuesta tras la solicitud de la prueba (TRT) es una tarea compleja, que implica un plan de trabajo, una formación y una selección del equipo[29-31]. El TRT se mide de la manera más fácil como el lapso de tiempo entre la llegada de la muestra de sangre al laboratorio y la emisión del resultado validado. Puede llevarse a cabo de modo manual, aunque tedioso, en una pequeña unidad. En un laboratorio computarizado, sin embargo, es relativamente sencillo registrar estos tiempos y después analizar los datos para calcular el tiempo medio y el percentil 95 para completar cada prueba; el porcentaje de pruebas completadas dentro de un tiempo predeterminado también es de valor[32]. La presentación gráfica asistida por ordenador de la distribución de la frecuencia de las pruebas completadas es una forma útil de mostrar los tiempos de respuesta tras la llegada de las pruebas individuales (fig. 24.3).

El tiempo de respuesta tras la llegada, como se ha definido previamente, se refiere a la etapa analítica de la prueba, y excluye el tiempo de retraso de las etapas preanalítica y postanalítica de la prueba. Cuando un laboratorio es responsable de las tres etapas, es posible ampliar la medición del tiempo de respuesta tras la llegada de las muestras al parámetro más significativo de tiempo de finalización de la solicitud (tiempo total desde que se inicia la solicitud hasta que se entregan los resultados al clínico). La velocidad a la que trabajan los sistemas modernos reduce la necesidad de interrumpir las muestras ordinarias para las pruebas urgentes, pero todavía se necesita una forma efectiva para transportar los resultados a los clínicos[33].

Pruebas en el punto de asistencia

Las pruebas en el punto de asistencia (PPA), también conocidas como *pruebas a la cabecera del paciente*, funcionan en dos niveles, dentro del hospital como un adjunto al laboratorio y en la atención primaria fuera del hospital.

Las áreas clínicas especializadas dentro de los hospitales tienen una necesidad cada vez mayor de un servicio de laboratorio construido según las especificaciones, que cumpla con sus propios requisitos. Cuando los resultados rápidos son especialmente importantes, las pruebas de laboratorio dentro del área clínica pueden ser la mejor solución. Las unidades de cuidados intensivos tienen unas necesidades establecidas de monitorizar los gases sanguíneos a la cabecera del paciente, pero otros clínicos utilizan las pruebas de laboratorio para controlar pacientes enfermos o para tomar decisiones rápidas en su tratamiento (p. ej., en las clínicas oncológicas de pacientes ambulatorios), y esto ha aumentado la demanda de un servicio de resultados rápidos. Las PPA también pueden ser necesarias cuando se realiza una prueba en sangre capilar no anticoagulada.

Los laboratorios de diagnóstico se localizan frecuentemente en áreas del hospital que están alejadas de los cuidados críticos y de los pacientes externos. Los sistemas de tránsito rápido, incluyendo los tubos neumáticos (v. anteriormente), pueden ser la alternativa preferida para establecer múltiples áreas de pruebas satélite, en particular

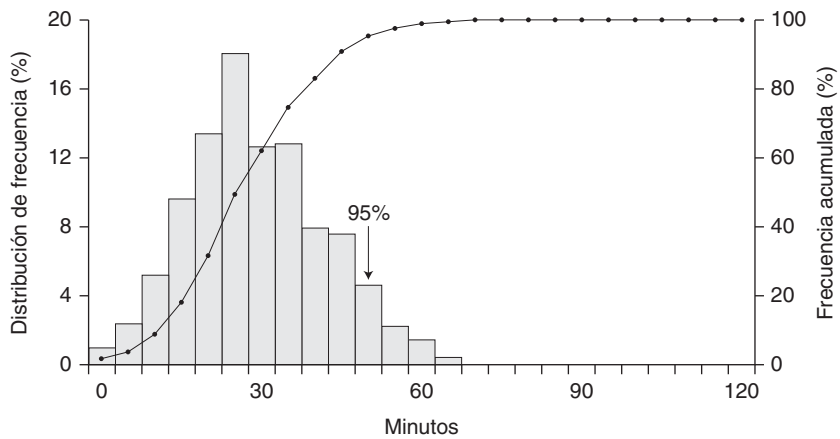


Figura 24.3. Histograma de frecuencia, porcentaje acumulado (•-•-•) y percentil 95 *(flecha)* que muestran el tiempo de finalización de los análisis para tiempos de protrombina no urgentes.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

cuando el laboratorio principal ya ofrece un servicio de resultados rápidos. Se necesita conocer el tiempo de respuesta tras la llegada de la muestra (v. fig. 24.3) para tomar una decisión correcta acerca de la necesidad de pruebas cerca del paciente en las áreas satélite. Cuando el equipo de PPA es la opción elegida, la dirección de los laboratorios satélites y el mantenimiento de sus equipos debe ser responsabilidad del servicio de análisis adecuado. Esto es esencial para el control de calidad, la seguridad y la acreditación, tanto si la plantilla del laboratorio satélite pertenece al personal del laboratorio, como en los sitios más atareados, como si es utilizada por la plantilla de médicos y enfermeros como una actividad marginal. Un miembro designado del personal de laboratorio debe supervisar este servicio, visitando cada lugar de las pruebas a diario y asegurando que todos los resultados y los datos del control de calidad se integran en el sistema principal informático del laboratorio. Algunos aparatos designados para las PPA almacenan datos del control de calidad en un disquete de ordenador, que se puede extraer y llevar al laboratorio principal. El British Committee for Standards in Haematology[34], la Joint Working Group on Quality Assurance[35] y la UK Medical Devices Agency[36d] han publicado guías para la organización de los servicios de las PPA. Hay también una norma internacional (ISO 22870).

Pruebas en el punto de asistencia más allá del laboratorio

Las PPA más allá del laboratorio son cada vez más populares en algunos países y son particularmente útiles cuando los pacientes viven a una distancia considerable del laboratorio del hospital. Los fabricantes de aparatos producen ahora aparatos portátiles o de sobremesa de uso sencillo, autocalibrados y con unas necesidades de mantenimiento mínimas. Las pruebas de laboratorio que se llevan a cabo de manera habitual incluyen la concentración de hemoglobina, el recuento de células sanguíneas con analizadores simples, la velocidad de sedimentación globular y el tiempo de protrombina para el control de la anticoagulación oral[37-40].

Aunque el uso de las PPA es independiente, el laboratorio del hospital local debe animar a los doctores y a los clínicos a que pidan consejo y ayuda en la selección del instrumento apropiado, su estandarización/calibración y su control de calidad, incluyendo la unión con el proyecto de valoración de calidad externa, en el que participa el laboratorio. La armonización de los informes con los registros del laboratorio es útil cuando un paciente es referido al hospital. Los estudios en el tratamiento del control de la anticoagulación han demostrado que con una formación adecuada y con cooperación por parte del laboratorio, los farmacéuticos son capaces de ofrecer un servicio igual de fiable que el del hospital, y con más ventajas para el paciente[41].

Una gran fuente de errores de las PPA fuera del hospital es la extracción defectuosa de las muestras, ya sea en vena o por pinchazo en el dedo. El personal clínico que asuma este procedimiento debe recibir una formación supervisada (v. cap. 1).

[d] Medicines and Healthcare-Products Regulatory Agency del Reino Unido.

Autoprueba del paciente

Hay una tendencia creciente a las autopruebas de los pacientes, y los controles de la glucosa para el autotratamiento de la diabetes son ya una práctica rutinaria. Disponemos ahora de coagulómetros precalibrados portátiles y sencillos, que usan la sangre capilar para medir el tiempo de protrombina y la Ratio Normalizada Internacional[38]. Se ha demostrado que los pacientes son capaces de manejar estos instrumentos correctamente, y una vez establecido su tratamiento, a cada paciente se le confía el mantenimiento de su propia anticoagulación dentro del rango terapéutico[41] (v. también págs. 402-403). La International Organization for Standardization (ISO) y los estándares europeos garantizan que dichos instrumentos sean fiables y que las instrucciones de su uso sean claras, sin ambigüedades y redactadas para los usuarios (v. pág. 540).

Servicios de laboratorio para médicos generales

Los clientes de un laboratorio de hematología son no sólo los médicos del hospital, sino también los médicos generales/médicos de familia, que tienen prioridades diferentes a las de los médicos del hospital. Una especial atención a las necesidades de estos médicos generales demuestra la calidad del laboratorio y potenciará que sigan refiriendo a los pacientes tras un primer uso de los servicios de laboratorio. En las secciones siguientes se resume un servicio apropiado construido según las especificaciones.

Garantía de calidad

Los médicos generales no son especialistas en medicina de laboratorio y necesitan pruebas de que el laboratorio de hematología proporciona un servicio de alta calidad. Éstas pueden basarse en la acreditación del laboratorio, en su participación en protocolos de control de calidad externos, en una buena reputación local entre los demás usuarios del laboratorio y en una voluntad de colaborar con los médicos generales en un programa de auditoría mutuamente beneficioso, incluyendo la participación en las PPA.

Servicio preanalítica

La formación del médico general es muy importante. Puede incluir un manual del usuario o un cartel mural (para mostrar un contenedor de la muestra correcto y el volumen de sangre que se necesita), rangos de referencia, requisitos para la preparación del paciente (p. ej., en ayunas), el tiempo de administración de cualquier medicamento que pueda afectar al resultado de la prueba y el tiempo de respuesta tras la llegada de cada prueba. Este último es importante para citar a los pacientes a consulta para decirles los resultados de la prueba. Los manuales deben tener el formato de cuaderno de hojas sueltas, para facilitar su actualización. Un boletín ocasional de noticias de laboratorio también puede ser valioso, particularmente cuando se introduce

una nueva muestra o servicio. La formación también puede incluir aspectos de la seguridad, del tipo de cómo manejar una salpicadura de sangre o una herida por pinchazo de aguja.

Una recogida eficiente de las muestras y su transporte son prioritarios. Un médico general puede necesitar que el personal del centro de salud esté formado y acreditado para la extracción de muestras de sangre. Un sistema de transporte de muestras en el momento del día acordado es particularmente importante, de manera que a los pacientes se les pueda dar una cita adecuada para la extracción de sangre. Los formularios de solicitud deben estar estandarizados en la medida de lo posible, con un único formulario de solicitud para todas las posibles patologías.

Servicio postanalítica

El médico general necesita un servicio de informes rápido para los resultados patológicos de las pruebas, por medio de un número de teléfono directo o un fax en el centro de salud. Para facilitar el contacto con el laboratorio, debería haber una línea directa de consulta con el hematólogo de guardia. Debido a este envío de los resultados por teléfono o por correo electrónico, se debe asegurar la confidencialidad mediante la identificación correcta del destinatario. En algunos países se está desarrollando el acceso a las páginas web por medio de una clave segura. Cuando no hay conexión electrónica con el laboratorio, puede ser más barato utilizar el servicio de transporte de las muestras para devolver los resultados de las pruebas a los médicos generales.

Procedimientos normalizados de trabajo

Los procedimientos normalizados de trabajo (PNT) son instrucciones por escrito que pretenden mantener una calidad del rendimiento coherente y óptima en el laboratorio. Deben cubrir todos los aspectos del trabajo, con algunas instrucciones referidas a los procedimientos de las muestras y otras referidas a la extracción de la muestra, la seguridad del laboratorio, el manejo de las muestras urgentes, el almacenaje de los datos, la política de informe por teléfono, etcétera. Se pueden basar en las descripciones de libros de texto estándar o en un manual de instrucciones del fabricante del aparato, pero deben reflejar la práctica diaria, y cada laboratorio debe preparar su propio conjunto de PNT. Hay que revisarlos una vez al año y en cada revisión se debe resaltar la fecha. Las versiones más antiguas se deben destruir, y hay que distribuir copias numeradas de la nueva versión a los lugares autorizados. En la tabla 24.7 se sugiere un formato de PNT.

AUDITORÍA Y ACREDITACIÓN DEL LABORATORIO

Auditoría

La auditoría del laboratorio es un análisis crítico y sistemático de la calidad del servicio del laboratorio. La esencia de la auditoría es que debería hacerse de forma continua y estar diseñada para alcanzar mejoras crecientes en la calidad del servicio diario. Debe comprender las etapas preanalítica, analítica y postanalítica de la práctica de laboratorio; en la tabla 24.8 se ofrecen algunos ejemplos.

La primera etapa de una auditoría es definir el estándar que se pretende alcanzar, que puede ser en la forma de un procedimiento normalizado de trabajo para un proceso analítico, un protocolo para la petición de pruebas, un plan de solicitud de transfusión de sangre prequirúrgica o un tiempo límite de respuesta tras la llegada de la muestra. Estos estándares se acuerdan dentro del laboratorio y, siempre que sea posible, junto con los principales usuarios del laboratorio. Los datos clínicos son de incalculable valor en relación con el significado clínico de los resultados generados por el analizador, la utilidad de la prueba (v. página 539), una apropiada utilización del laboratorio[15] y las ventajas e inconvenientes de las pruebas en el punto de asistencia[42-43]. Para monitorizar el rendimiento frente a los estándares acordados, cada sección del laboratorio debe formar su propio grupo auditor o, si hay un grupo auditor para todo el departamento, debería estar abierto a todas las categorías del personal, para facilitar las revisiones por pares, y para aprovechar el valor formativo de una auditoría. El personal del laboratorio debe dirigir la auditoría, más que recibirla como una imposición. Es una buena práctica hacer un pequeño informe de cada reunión de auditoría, registrar la asistencia, los puntos identificados como mejorables y una lista de actuaciones.

En el Reino Unido, las organizaciones de profesionales relevantes han creado un grupo de dirección para controlar los riesgos graves de una transfusión («SHOT», del inglés *serious hazards of transfusion*). Una gran proporción de los incidentes ocurridos se deben a una mala identificación muestra-paciente, con recogida de la sangre incorrecta del banco de sangre del hospital o de los refrigeradores satélites, o con fallos en los procedimientos de comprobación en la cabecera del paciente[44] (v. también pág. 449).

El proceso de auditoría mejora la calidad simplemente por examinar y cuestionar las guías y los estándares establecidos. La necesidad siempre creciente de la rentabilidad puede fraguar relaciones de trabajo más cercanas entre las diferentes ramas de la patología, así como entre laboratorios de la misma disciplina. Este ambiente de laboratorio tan cambiante pone de manifiesto la necesidad de una formación continuada en una buena gestión del laboratorio para el personal de hematología y en la importancia de la auditoría.

Acreditación

El propósito de un plan de acreditación del laboratorio es permitir la auditoría externa de la organización del laboratorio, de la gestión, del programa de garantía de calidad y del nivel de satisfacción del usuario. La ventaja de un laboratorio acreditado es que, de esta forma, indica a los usuarios clínicos que tiene un estándar definido de prácti-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 24.7. Formato de un procedimiento normalizado de trabajo (PNT)

Página inicial Título, número de referencia, fecha de preparación, nombre del autor, nombre del autorizador
Ámbito Propósito del PNT, principios del procedimiento o prueba; categoría/s del personal autorizado a desarrollar la/s tarea/s
Requisitos de las muestras Tipo y cantidad; acuerdos de transporte; condiciones de almacenamiento, y cualquier restricción de tiempo o temperatura
Recepción de las muestras Registro y comprobación del cuestionario de solicitud; criterios para rechazar una muestra
Precauciones de seguridad Requisitos obligatorios de protección Manejo de las muestras de «alto riesgo»
Equipo y reactivos Listas de equipamiento, aparatos, reactivos, controles, calibradores, formularios y artículos de papelería
Procedimiento de la prueba Detalles del método paso a paso, cálculo de los resultados, revisión de los controles de calidad
Informe Procedimiento de informe de los resultados en solicitudes urgentes y ordinarias
Importancia clínica Comprensión de la razón clínica de la prueba y el significado de los resultados alterados Rangos de referencia para sujetos sanos y límites de confianza
Limitaciones de la prueba Cómo reconocer los errores y los pasos para evitarlos o corregirlos
Mantenimiento del equipo Lista del plan de mantenimiento interno rutinario (diario, semanal) y de servicio
Almacenamiento de muestras posprueba Período de retención y condiciones para el almacenamiento: instrucciones para la eliminación de muestras y submuestras diluidas Lista de la bibliografía relevante Fecha en la que se debe revisar el PNT

ca, que ha sido confirmado de manera independiente en una revisión por pares externa. Dicha revisión debe incluir la valoración de la estructura funcional básica (instalaciones del laboratorio, personal y equipo), de los procesos (análisis de las pruebas), del resultado (calidad de los resultados de las pruebas, incluyendo la puntualidad de los datos y su interpretación), interacción con los usuarios clínicos y el uso óptimo de los recursos.

En algunos países, la certificación de la acreditación es llevada a cabo por organismos autorizados por el gobierno. En el Reino Unido, esta función es responsabilidad del UK Accreditation Service (UKAS) y del National Measurement Accreditation Service (NAMAS)[45], que no acredita a los laboratorios en términos generales, sino que valida pruebas específicas que se desarrollan en el laboratorio, certificando que estas pruebas están actualizadas, son reconocidas como una práctica estándar y cumplen con los estándares ISO (v. pág. 549). En los Estados Unidos, el control se lleva de manera similar por la política de regulación de las Clinical Laboratories Improvement Amendments (CLIA 1988)[46,47]. En Australia, el control es realizado por una autoridad del gobierno, el National Pathology Accreditation Advisory Council (NPAAC), que fija los estándares para la acreditación de los laboratorios. Por el contrario, en el Reino Unido, la UK Clinical Pathology Accreditation Ltd (CPA)[48,49] acredita a la mayoría de los laboratorios clínicos; éste es un organismo profesional no gubernamental, pero con relación con los UKAS. Es menos restrictivo con la gama de pruebas que se le permiten realizar a un laboratorio en concreto, pero comprueba la capacidad del laboratorio de proporcionar un estándar satisfactorio, como se demuestra por un adecuado control de la calidad; participación en un proyecto de valoración de la calidad externo, y la inspección *in situ* de las instalaciones, la plantilla y la dirección.

Algunos programas nacionales han establecido vínculos formales entre ellos, como la European Co-operation for Accreditation of Laboratories (EAL) y la Western European Laboratory Accreditation Co-operation (WELAC).

Las descripciones de los requisitos para los programas nacionales de acreditación están disponibles para los Estados Unidos[47], Reino Unido[49] y Australia[50]. Las versiones actualizadas de estos documentos se encuentran en sus páginas web. Un componente importante de todos los programas de

Tabla 24.8. Ejemplos de auditoría de laboratorio
Formación de los usuarios de laboratorio
Adecuación de las solicitudes de las pruebas
Menú de pruebas en respuesta a las necesidades clínicas
Adecuación de las muestras sanguíneas (p. ej., volumen adecuado)
Interpretación de los resultados anómalos
Puntualidad de los informes
Resultados del control de calidad interno
Desarrollo del plan de valoración de la calidad externo
Rentabilidad de las pruebas especializadas
Informe de los resultados anómalos
Cumplimiento de las políticas de seguridad
Utilización de sangre y productos sanguíneos
Frecuencia y causa de las reacciones a la transfusión
Tiempo de respuesta tras la llegada de las solicitudes urgentes
Satisfacción de los pacientes externos sometidos a venopunción
Satisfacción de los usuarios del laboratorio

acreditación es la participación en proyectos de comprobación de las habilidades/valoración externa de la calidad. Se espera que estos planes cumplan con los estándares que se especifican en la guía 43 ISO/IEC, y en el documento de Guía del ILAC G13/2000 de la International Laboratory Accreditation Co-operative (ILAC) (*Requirements for the competence of providers of proficiency testing schemes*, es decir, Requisitos para la aptitud de proveedores de protocolos de pruebas de eficiencia).

ESTÁNDARES INTERNACIONALES DE PRÁCTICA

La International Standards Organization (ISO) ha establecido guías para la práctica del laboratorio. De especial importancia son la ISO 15189, titulada *Medical laboratories-particular requirements for quality and competence* («Requisitos particulares de los laboratorios médicos para asegurar su calidad y aptitud»), que fija las reglas para la gestión del laboratorio; la serie ISO 9000, titulada *Quality management and quality siystems* («Gestión de calidad y sistemas de calidad»), y la Guía 25, titulada *General requirements for the technical competence of testing laboratories* («Requisitos generales para la aptitud técnica de los laboratorios de pruebas»). En la tabla 24.9 se enumeran otros estándares relevantes de la ISO y de la autoridad europea CEN.

Tabla 24.9.	Estándares ISO y normas europeas (EN) sobre prácticas de laboratorio médico
ISO9000	Serie de estándares y guías para la selección y el uso de los sistemas de gestión de calidad y garantía de calidad (los aspectos complementarios se especifican en la ISO 9001-9004)
ISO15189	Laboratorios médicos: requisitos particulares para la calidad y la aptitud
ISO22869	Documento de orientación para la puesta en marcha de la ISO 15189 (antes Guía ISO 25)
ISO22870	Apéndice de la ISO 15189 en relación con la calidad de las pruebas en el punto de asistencia
ISO15194	Instrumentos médicos para el diagnóstico *in vivo:* medición de las cantidades en muestras de origen biológico; descripción de los materiales de referencia
EN12286	Instrumentos médicos para el diagnóstico *in vitro:* presentación de los procedimientos de las mediciones de referencia
EN13612	Evaluación del desempeño de los dispositivos médicos para el diagnóstico *in vitro*
ISO15198	Validación de las recomendaciones del fabricante para el control de calidad por parte del usuario
EN375	Información proporcionada por los fabricantes con los reactivos de diagnóstico *in vitro*
EN591	Instrucciones para el uso de los instrumentos de diagnóstico *in vitro*
EN592	Instrucciones para el uso de los instrumentos de diagnóstico *in vitro* para la autoprueba
EN13532	Requisitos generales para los aparatos médicos de diagnóstico *in vitro* de las autopruebas
ISO17593	Requisitos para los sistemas de monitorización *in vitro* de las autopruebas de la terapia de anticoagulación oral
EN14136	Uso de planes de valoración externa de la calidad en la valoración del desarrollo de los procedimientos de diagnóstico *in vitro*
ISO6710	Contenedores de un solo uso para la extracción de muestras de sangre venosa
ISO15190	Gestión de la seguridad de los laboratorios médicos

EN, Comité Européen de Normalisation; ISO, International Organization for Standardization.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

COMPARATIVA

El objetivo de la *comparativa*[51] es proporcionar un punto de referencia a los laboratorios para que valoren su rendimiento en comparación con otros laboratorios y con los líderes de ese campo. Los servicios se dividen en diversas categorías según su tamaño, si son docentes o no, y si son responsables de actividades especiales. Sus respuestas a un largo cuestionario anual permiten evaluar varios aspectos de la práctica del laboratorio. Mediante la estandarización de la definición de las pruebas y las solicitudes, es posible establecer un método acordado para estimar la carga de trabajo de manera estándar, y proporcionar unos criterios óptimos para los niveles del personal, sus distintas habilidades, productividad y rentabilidad, teniendo en cuenta las necesidades clínicas y la población local de pacientes («mezcla de casos»). Por tanto, la *comparativa* juzga la calidad de un servicio de laboratorio valorando si puede llevarse de manera más eficiente mejorando la rentabilidad y la eficacia clínica. Proporciona una valoración de la adecuación de la dotación del personal con medidas realistas de parámetros de carga de trabajo, indicaciones sobre cómo mejorar el rendimiento de las pruebas y el tiempo de los informes, teniendo en cuenta la forma en que las variaciones en la práctica clínica pueden afectar al servicio de laboratorio y si se puede mejorar la rentabilidad y el beneficio clínico mediante la descentralización de algunos componentes o, por el contrario, mediante la eliminación de unidades satélite. Se ha convertido en un método esencial para lograr una mejora sostenible continua, basada en las pruebas más que en la intuición.

En los Estados Unidos, el College of American Pathologists Laboratory Improvement Program estableció un plan conocido como el *sondeo-Q* en 1989, para facilitar la puesta en marcha de los requisitos de la CLIA´88, proporcionando a los laboratorios una continua revisión por pares y una formación, con una auditoría *in situ* periódica. Los informes de varios estudios del *sondeo-Q* se publican con regularidad en los *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. En el Reino Unido se ha desarrollado un plan similar para cumplir con los requerimientos de la Commission for Health Improvement (CHI). Lo lleva a cabo la Clinical Benchmarking Company, que forma una sociedad establecida por la Clinical Management Unit of the Centre for Health Planning en la Universidad de Keele con la Newchurch Limited, una compañía de servicios informáticos. Para la hematología y otras disciplinas basadas en el laboratorio, este plan funciona con un equipo de consejeros designados nombrados por el Royal College of Pathologists. La valoración del desempeño de un laboratorio en concreto se basa en la comparación con el mejor desempeño en un grupo de pares comparable. Su página web es www.newchurch.co.uk/consulting y su dirección de correo electrónico de contacto es benchmarking@newchurch.co.uk. Otra página web que describe los programas adecuados es www.4sdawn.com/benchmarking.

BIBLIOGRAFÍA

1. Stuart J, Hicks JM 1991 Good laboratory management: an Anglo-American perspective. Journal of Clinical Pathology 44:793-797.
2. Royal College of Pathologists 2002 Background information on the continuing professional development (CPD) scheme. Royal College of Pathologists, London.
3. Du Boulay C 1999 Continuing professional development: some new perspectives. Journal of Clinical Pathology 52: 162-164.
4. Canadian Institute for Health Information 2002 Management information systems guidelines: clinical laboratory workload measurement system. CIHI, Ottawa K1N 9N8.
5. College of American Pathologists Workload and personnel management committee 1992 Workload Recording Method and Personnel Management Manual. College of American Pathologists, Northfield, IL.
6. Bennett CHN 1991 Welcan UK: its development and future. Journal of Clinical Pathology 44:617-620.
7. Macdonald AJ, Bradshaw AE, Holmes WA, et al 1996 The impact of an integrated haematology screening system on laboratory practice. Clinical and Laboratory Haematology 18:271-276.
8. International Organization for Standardization 1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement, methods and results. ISO 5725 Parts 1-4. ISO, Geneva.
9. Ellison SLR, Rosslein M, Williams A 2000 Eurachem-CITAC Guide: Quantifying uncertainty in analytic measurement, 2nd ed. Eurachem Secretariat, eurochem@fc.ul.pt.
10. Galen RS, Gambino S 1975 Beyond normality: the predictive value and efficiency of medical diagnoses. Wiley, New York.
11. Griner PF, Nayawski RJ, Mushlin AI, et al 1981 Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures: principles and applications. Annals of Internal Medicine 94:553-592.
12. Youden WJ 1950 Index for rating diagnostic tests. Cancer 3:32-35.
13. Shapiro MF, Hatch RL, Greenfield S 1984 Cost containment and labor-intensive tests: the case of the leukocyte differential count. Journal of the American Medical Association 252:231-234.
14. Hernandez JS 2003 Cost-effectiveness of laboratory testing. Archives of Pathology and Laboratory Medicine 127:440-445.
15. van Walraven C, Naylor CD 1998 Do we know what inappropriate laboratory utilization is? A systematic review of laboratory clinical audits. Journal of the American Medical Association 280:550-558.
16. International Council for Standardization in Haematology1994 Guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting and cell marker applications. Clinical and Laboratory Haematology 16:157-174.
17. Bland JM, Altman D G 1986 Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet i:307-310.
18. Bullock DG, Wilde CE 1985 External quality assessment of urinary pregnancy oestrogen assay: further experience in the United Kingdom. Annals of Clinical Biochemistry 22: 273-282.
19. Henry JB, Kelly KC 2003 Comprehensive graphic-based display of clinical laboratory data. American Journal of Clinical Pathology 119:330-336.

20. Powsner SM, Tufte ER 1999 Graphical summary of patient status. Lancet 344:386-389.
21. Lee N, Millman A 1996 ABC of Medical Computing. BMA Publishing, London.
22. Kiley R 1999 Medical information on the internet: a guide for health professionals. Churchill Livingstone, Edinburgh.
23. Narayanan S 2000 The preanalytic phase: an important component of laboratory medicine. American Journal of Clinical Pathology 113:429-452.
24. Bareford D, Hayling A 1990 Inappropriate use of laboratory services: long term combined approach to modify request patterns. British Medical Journal 301:1307.
25. Fraser CG, Woodford FP 1987 Strategies to modify the test-requesting patterns of clinicians. Annals of Clinical Biochemistry 24:223-231.
26. Mutimer D, McCauley B, Nightingale P, et al 1992 Computerised protocols for laboratory investigation and their effect on use of medical time and resources. Journal of Clinical Pathology 45:572-574.
27. Bologna LJ, Lind C, Riggs RC 2002 Reducing major identification errors within a deployed phlebotomy process. Clinical Leadership and Management Review 16:22-26.
28. Keshgegian AA, Bull GE 1992 Evaluation of a soft-handling computerized pneumatic tube specimen delivery system. Effects on analytical results and turnaround time. American Journal of Clinical Pathology 97:535-540.
29. Howanitz JH, Howanitz PJ 2000 Laboratory results: timeliness as a quality attribute and strategy. American Journal of Clinical Pathology 116:311-315.
30. Hilbourne LH, Oye RK, McArdle JE, et al 1989 Use of specimen turnaround time as a component of clinician expectations with laboratory performance. American Journal of Clinical Pathology 92:613-618.
31. Winkelman JW, Tansijevic MJ, Wynbenga DR, et al 1997 How fast is fast enough for clinical laboratory turnabout time: Measurement of the interval between result entry and inquiries for reports. American Journal of Clinical Pathology 108:400-405.
32. Valenstein PN 1996 Laboratory turnaround time. American Journal of Clinical Pathology 105:676-688.
33. Hillbourne L, Lee H, Cathcart P 1996 STAT testing? a guideline for meeting clinician turnaround time requirements. American Journal of Clinical Pathology 105:671-675.
34. England JM, Hyde K, Lewis SM, et al 1995 Guide-lines for near patient testing: haematology. Clinical and Laboratory Haematology 17:301-310.
35. Joint Working Group on Quality Assurance 1999 Guidelines: Near to patient or point of care testing. Clinical and Laboratory Haematology 21(Supplement, Advancing Laboratory Haematology):31-34.
36. Medical Devices Agency 2002 Management and use of IVD Point of care test devices. MDA, UK Department of Health, London.
37. Baer DM, Belsey RE 1995 Physician's office testing. In: Lewis S M, Koepke JA (eds) Haematology laboratory management and practice. Butterworth Heinemann, Oxford, Ch. 5.
38. Machin SJ, Mackie IJ, Chitolie A, et al 1996 Near patient testing (NPT) in haemostasis—a synoptic review. Clinical and Laboratory Haematology 18:69-74.
39. Cachia PG, McGregor E, Adlakha S, et al 1998 Accuracy and precision of the TAS analyzer for near-patient INR testing by non-pathology staff in the community. Journal of Clinical Pathology 51:68-72.
40. Rose PE, Fitzmaurice D 1998 New approaches to the delivery of anticoagulant services. Blood Reviews 12:84-90.
41. Ansell JE, Patel N, Ostrovsky D, et al 1995 Long term patient self-management of oral anticoagulation. Archives of Internal Medicine 155:2185-2189.
42. Gray TA, Freedman DB, Burnett D, et al 1996 Evidence based practice: clinicians' use and attitudes to near patient testing. Journal of Clinical Pathology 49:903-908.
43. Klee GG, Spackman KA, Habermann TM 1995 Targeting the usage and reporting of hematological laboratory tests to help streamline patient care. In: Lewis S M, Koepke JA (eds) Hematology laboratory management and practice. Butterworth Heinemann, Oxford, Ch. 17
44. Asher D, Atterbury CLJ, Chapman C et al 2002 6th Annual report: Serious hazards of transfusion. This and all previous reports are available on the SHOT website.
45. UK Accreditation Service (UKAS) 2000 The conduct of UKAS laboratory assessments. UKAS Publications, Feltham TW13 4UN, UK.
46. Bachner P, Hamlin WB 1995 Regulatory and professional standards affecting clinical laboratories. In: Lewis S M, Koepke JA (eds) Hematology laboratory management and practice. Butterworth Heinemann, Oxford, Ch. 20.
47. College of American Pathologists 1998 Standards for laboratory accreditation. College of American Pathologists, Northfield, IL.
48. CPA (UK) Ltd 2000 Standards for the medical laboratory. CPA(UK)Ltd, Sheffield S10 2PB.
49. CPA (UK) Ltd 2000 Accreditation Handbook. CPA(UK)Ltd, Sheffield S10 2PB.
50. Hynes AF, Lea AR, Hailey DM 1989 Pathology laboratory accreditation in Australia. Australian Journal of Medical Laboratory Science 10:12.
51. Galloway M, Nadin L 2001 Benchmarking and the laboratory. Journal of Clinical Pathology 54:590-559.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

25 Seguridad en el laboratorio

S. Mitchell Lewis

Diseño de las instalaciones	554	Muestras biopeligrosas	555
Seguridad radiológica y eléctrica	554	Precauciones universales	555
Riesgo de incendio	554	Desinfectantes químicos	556
Seguridad química	555	Aplicaciones de los desinfectantes	556
Instalaciones para el lavado de los ojos	555	Eliminación de residuos	558
		Transporte de las muestras	558

Todo trabajador de un laboratorio debe conocer los riesgos potenciales de su lugar de trabajo, incluyendo los sitios donde se llevan a cabo las pruebas en los puntos de atención, almacenes de reactivos y refrigeradores satélite de almacenamiento que contienen sangre y productos sanguíneos. Es importante para ellos garantizar la seguridad en su práctica, desde la extracción de la muestra hasta la eliminación de los residuos. El jefe de servicio debe desarrollar una estrategia para proteger la salud y el bienestar de todos los miembros de su plantilla y de los visitantes autorizados. Los procedimientos que se deben seguir tienen que cumplir con las normas obligatorias y con las regulaciones, al igual que con las prácticas locales.

Tiene que haber un responsable designado de la seguridad, de suficiente categoría, con autoridad para poner en marcha la política de seguridad del servicio en todas las secciones del laboratorio. El encargado de la seguridad tiene que ser responsable de la gestión diaria de los puntos de seguridad, y es el responsable directo ante el jefe de servicio. Debe haber un protocolo establecido para el manejo de los pinchazos por aguja en un miembro de la plantilla, que habrá de ser referido inmediatamente al servicio de salud laboral adecuado del hospital, el cual debe disponer de un servicio de asesoramiento de 24 h. Todos los incidentes se deben registrar; se deben revisar los protocolos de seguridad, y se deben tomar medidas para prevenir la recurrencia.

El responsable de la seguridad tiene que tener la formación y el tiempo suficientes para hacer el trabajo bien, y ofrecer formación al personal, que no debe estar autorizado a manejar materiales potencialmente peligrosos hasta que hayan completado su formación, de acuerdo con los requisitos de seguridad. El responsable de la seguridad tiene que representar al laboratorio en las comisiones relevantes de seguridad y colaborar estrechamente con los responsables de salud laboral del hospital, de control de la infección y de protección radiológica. Dentro del servicio, hay que establecer una comisión de seguridad que actúe como un foro útil par revisar la seguridad.

Hay que documentar la política de seguridad del servicio como «procedimientos normalizados de trabajo» (PNT) que sean fácilmente accesibles en cada sección del laboratorio. El informe debe ofrecer una amplia explicación de la política de seguridad del servicio (tabla 25.1). Hay que prestar atención a los peligros potenciales y conocidos en relación con la infección, las sustancias tóxicas, el fuego, la radiación o el daño mecánico. Cuando no se pueda eliminar un peligro, se debe reducir el riesgo en la medida de lo posible (p. ej., disminuyendo la frecuencia y el período de exposición). El procedimiento de seguridad debe hacer referencia a la legislación de seguridad local, nacional e internacional.

Además del documento que establece la política de seguridad del laboratorio, los PNT deben incluir también información acerca del manejo de los reactivos que están clasificados como *peligrosos para la salud* por las autoridades competentes, junto con los protocolos importantes de seguridad y descontaminación, como se describe en este capítulo.

La International Organization for Standardization (ISO 15190)[1] estableció un estándar para la gestión de la seguridad en los laboratorios médicos. En él se ofrecen una serie de normas para lograr un ambiente de trabajo seguro en el laboratorio e incluye una extensa lista de puntos que se deben comprobar cuando se haga una auditoría de las prácticas de seguridad. La International Electrotechnical Commission (IEC)[2] redactó un documento similar acerca de la seguridad en el equipo eléctrico utilizado en los laboratorios.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) también ha publicado extensos manuales sobre la seguridad en los laboratorios sanitarios[3,4] y hay un vínculo de la página web de la OMS a la Red Global de Inyección Segura (Safe Injection Global Network) (www.who.int/injection_safety), que describe las estrategias para manejar la sangre de forma segura. Aquí se incluyen: *a)* la selección de donantes de sangre, las pruebas de las unidades de sangre, el uso clínico apropiado de la sangre y (cuando sea pertinente) la in-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 25.1. Puntos que hay que incluir en el documento de la política de seguridad del laboratorio

Extracción de sangre
Etiquetado, transporte y recepción de las muestras
Manejo de las muestras y de la contención de muestras de alto riesgo
Localización del equipo de protección
Manejo e informe de las heridas por pinchazo
Manejo de la salpicadura a los ojos
Eliminación de agujas, jeringuillas y lancetas usadas
Procedimiento para el vertido de sangre
Valoración del riesgo de peligro de todas las sustancias del laboratorio
Seguridad en las pruebas cerca del paciente
Ropa de protección
Registros de la salud del personal, incluyendo su inmunización
Seguridad del laboratorio, horas extra de trabajo y visitantes del departamento
Eliminación de residuos
Revisión del equipo eléctrico
Registro de accidentes
Monitorización de la cabina de seguridad
Política de limpieza del laboratorio
Política de recepción y envío postal de las muestras
Protección radiológica
Precauciones contra incendios
Programas de formación del personal
Inspecciones de seguridad
Programa de reuniones del comité de seguridad

activación vírica del material humano para uso terapéutico; *b)* el uso seguro y apropiado de las inyecciones, el manejo de los desechos punzantes y la prevención de la infección cruzada, y *c)* los procedimientos llevados a cabo de acuerdo con las precauciones universales. Las actividades globales sobre este tema se informan regularmente por correo electrónico, si se solicita a sign@who.int.

En muchos países no hay unos requisitos obligatorios para la seguridad en el trabajo a nivel nacional; incluidos hospitales y laboratorios clínicos. En el Reino Unido, la autoridad competente es el Health and Safety Executive, que ha establecido procedimientos para la prevención de infecciones en los laboratorios clínicos[5]. Otras normas esenciales del laboratorio son las *Normas sobre Radiaciones Ionizantes* (2006)[6], las *Normas para el control de sustancias peligrosas para la salud* (COSHH) (2002)[7] y la *Normativa para los organismos modificados genéticamente* (2000)[8]. La toxicidad de todos los reactivos químicos, incluyendo aquellos que vienen incorporados a los equipos, debe ser categorizada y certificada por la COSHH, de acuerdo con el grado de peligro biológico y físico, las medidas de seguridad para su uso, el manejo de los vertidos y la eliminación de los residuos. Holt[9] describió el manejo de estas regulaciones y los métodos de investigación de accidentes.

Los requisitos específicos de seguridad que se deben considerar en la práctica de laboratorio se describen en las siguientes secciones. Incluyen el diseño de las instalaciones, la seguridad radiológica y eléctrica, el peligro de incendio, los reactivos tóxicos y carcinogénicos, el manejo de material biopeligroso y la eliminación de residuos.

DISEÑO DE LAS INSTALACIONES

El área de trabajo debe ser suficientemente grande como para contener fácilmente los componentes del equipo, los cuales deben estar instalados sobre superficies fijas o carritos estables. Si es posible, el equipo que haga demasiado ruido se mantendrá separado del área general de trabajo. Se debe asegurar una luz óptima, y debe haber una ventilación adecuada protegida del polvo. Tiene que haber instalaciones apropiadas para almacenar los productos químicos (v. más adelante). Los extintores de fuego y los botiquines de primeros auxilios tienen que estar instalados en lugares fácilmente accesibles. El área de trabajo del laboratorio debe cumplir los diseños estándar para el «nivel 2 de contención»; tiene que haber un acceso restringido, que debe estar reforzado donde sea posible.

Seguridad radiológica y eléctrica

El fabricante debe certificar que todos los equipos eléctricos cumplen con los estándares de seguridad nacionales e internacionales. El equipo eléctrico no debe interferir eléctricamente con dispositivos médicos *in vivo* (p. ej., un marcapasos), a menos que esté claramente señalado con una advertencia apropiada. Antes de su instalación, una persona formada en realizar pruebas con dispositivos portátiles debe revisar todos los aparatos eléctricos, y debe asegurarse de que todos los enchufes, los fusibles y los cables eléctricos son los adecuados y funcionan, y de que los enchufes y los cables no están cerca de grifos de agua. Tiene que haber un programa establecido de mantenimiento preventivo para cada parte del equipo eléctrico. Se debe descontaminar todo el equipo antes de una inspección o de una reparación.

La protección necesaria cuando se maneja material radioactivo y el uso del equipo para medir la radioactividad se describen en la página 306.

Riesgo de incendio

Muchos incendios son el resultado de accidentes con sustancias inflamables, como el alcohol y los disolventes. Todas las manipulaciones de dichas sustancias se deben

realizar lejos de cualquier llama sin protección. Los depósitos de estas sustancias se deben guardar en contenedores protegidos contra las llamas, en un área de almacenamiento separada del laboratorio y claramente señalada como *inflamable*. No se deben tener más de 400 ml en una poyata o una estantería abiertos. Los quemadores de gas nunca se deben dejar desatendidos y las luces de los pilotos nunca se deben dejar encendidas durante la noche. Los quemadores tienen que estar tan cerca de la fuente de gas como sea posible y se deben evitar los tubos de conexión largos.

Los extintores de fuego, sobre todo aquellos que son apropiados para los fuegos químicos o eléctricos, y las mantas ignífugas se deben colocar cerca de las puertas de las salas y en puntos estratégicos en los pasillos. Se tienen que revisar periódicamente.

Seguridad química

Los productos químicos peligrosos, tales como los ácidos y álcalis fuertes, se deben almacenar a nivel del suelo. Hay que guardar tan alejados como sea posible los productos químicos susceptibles de reaccionar entre sí; los venenos se deben guardar en armarios cerrados. Las hojas del fabricante con los datos de seguridad de los productos se deben revisar para obtener información acerca del manejo seguro de cualquier sustancia carcinogénica o potencialmente tóxica. Tales reactivos se deben almacenar en lugares seguros con acceso restringido; sólo los debe manejar el personal con experiencia que vista ropa de protección, y hay que pesarlos en una cabina de flujo de aire con una velocidad de pasaje de 0,8 m/s.

Instalaciones para el lavado de los ojos

Se debe situar convenientemente un lugar para el lavado de los ojos en aquellas áreas donde se manejen productos químicos peligrosos o material biológico. Debe consistir en un dispositivo de pulverización conectado a un suministro de agua por medio de una manguera flexible. Si no se dispone de un acceso a las tuberías, una alternativa es un amplio suministro de contenedores de fácil apertura con agua estéril o con solución salina isotónica.

MUESTRAS BIOPELIGROSAS

Cuando se manejan muestras de sangre, los patógenos humanos más frecuentemente encontrados son el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y los virus de la hepatitis.

Todas las muestras de origen humano se deben considerar como potencialmente infecciosas, por lo que han de manejarse de forma apropiada, siguiendo unas precauciones universales para minimizar la exposición de la piel y las membranas mucosas al peligro. Es necesario tomar precauciones especiales con las muestras altamente infecciosas (v. más adelante).

Precauciones universales

1. Hay que adoptar medidas de higiene personal en las áreas donde se extrae la sangre, donde se manejan las muestras y donde se realiza el trabajo de análisis:
   a) Está absolutamente prohibido comer, beber y aplicarse cosméticos.
   b) El personal no debe usar joyas y, de manera ideal, tampoco relojes ni anillos.
   c) Se deben llevar guantes de plástico o de látex desechables durante el manejo de las muestras y el trabajo de análisis[a].
   d) La ropa personal no puede sobresalir más allá de las mangas de la ropa de protección.
   e) Cualquier abrasión o corte expuesto debe cubrirse con vendajes resistentes al agua.
   f) Hay que lavarse las manos cuando se abandonan las áreas de análisis.
2. La venopunción se debe realizar con guantes de plástico fino o de látex desechables. Hay tener cuidado para evitar los pinchazos cuando se manejan jeringuillas o se desechan agujas. No volver a enfundar las agujas usadas con la mano, no separar la aguja de la jeringa ni romper, doblar o manipular de algún modo las agujas usadas con las manos. Las agujas y jeringas desechables usadas, lancetas y otros objetos afilados, como los portaobjetos de cristal, se deben colocar en un contenedor de plástico «para materiales punzantes» resistente a la punción para su eliminación. Hay que tener cuidado de evitar la contaminación de sangre en los torniquetes, pues puede ser una causa potencial de infección cruzada. Si fuera necesario, lavarlos con agua y jabón.
3. En la medida de lo posible, sólo se deben utilizar jeringas, agujas y lancetas desechables. Las jeringas y lancetas nunca se deben reutilizar en una persona diferente.
4. Las muestras se deben enviar al laboratorio en bolsas de plástico individuales y cerradas, separadas del formulario de solicitud para prevenir su contaminación en el caso de que haya algún escape de la muestra. De manea ideal, la bolsa de plástico se debería colocar dentro de otro contenedor. Los tubos que minimizan el riesgo de escape se describen en la página 2.
5. Pipetear con la boca está terminantemente prohibido.
6. La centrifugación se debe realizar con las cubetas de centrífuga cerradas herméticamente.

[a] Las reacciones irritantes a los guantes de plástico y al látex pueden ser debidas a una fricción mecánica de la piel por un mal ajuste de los guantes, uso prolongado sin cambiarse de guantes, transpiración o una alergia específica. Lavarse las manos con un jabón antiséptico suave y una crema de manos antiinflamatoria pueden ser de ayuda. También puede ser útil usar guantes libres de polvo y utilizar una talla mayor del guante para aumentar la circulación del aire hasta que las manos cicatricen. En el caso de una alergia específica a los ingredientes químicos del guante, puede merecer la pena probar un tipo o una marca diferente de guantes.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

7. Los portaobjetos con sangre y médula ósea se deben manejar de la misma forma que las muestras de sangre hasta que se fijen con metanol, se tiñan y se cubran con cristal.
8. Hay que colocar el material usado en las bolsas de plástico dedicadas al material biopeligroso mientras se espera su eliminación (v. más adelante).
9. La ropa de protección del laboratorio (p. ej., batas blancas) nunca deben usarse fuera de él.
10. Las precauciones adicionales en el manejo de material altamente infeccioso incluyen:
    a) Sólo el personal con experiencia debe llevar a cabo los procedimientos.
    b) Las muestras se deben procesar en una cabina de seguridad microbiológica (si el procedimiento implica la generación de aerosoles) o en un área del laboratorio claramente designada y señalada.
    c) Las muestras se deben manejar utilizando ropa protectora (guantes desechables bien ajustados, delantal de plástico desechable, gafas o protectores oculares, mascarilla).
    d) Hay que emplear plástico desechable en lugar de cristal y no deberían utilizarse instrumentos acabados en punta (p. ej., tijeras).
    e) Debe haber acuerdos especiales para la eliminación de residuos (v. pág. 558).

Desinfectantes químicos

Hay varios tipos de productos químicos que se pueden utilizar como germicidas, incluyendo aldehídos, fenoles, halógenos, alcoholes e hipocloritos. Sin embargo, no hay un único desinfectante que sea efectivo contra todos los patógenos y su efectividad dependerá de la naturaleza del organismo (tabla 25.2)[4,10].

Hipoclorito sódico (cloro)

El hipoclorito sódico (cloro) es el desinfectante más frecuentemente utilizado en el laboratorio, ya que es muy activo frente a todos los microorganismos, aunque es menos efectivo para los hongos. Su inconveniente es que es corrosivo para el metal. Dado que las soluciones de hipoclorito pierden gradualmente su fuerza, se deben hacer soluciones frescas a diario. Para uso general, se necesita una concentración de 1 g/l (1.000 ppm) de cloro disponible; si se trata de un vertido de sangre necesitaremos una concentración de 5 g/l (5.000 ppm).

Las lejías domésticas contienen 50 g/l de cloro disponible y tiene que diluirse, por tanto, a 1:50 para su uso general y a 1:10 para la contaminación con sangre. Otros compuestos que contienen cloro y que se pueden utilizar se preparan de la siguiente manera:

Hipoclorito cálcico (70% de cloro disponible): 1,4 g/l; 7 g/l para la contaminación con sangre.

Dicloroisocianuro sódico (NaDCC) (60% de cloro disponible): 1,7 g/l; 20 g/l para la contaminación con sangre.

Cloramina (25% de cloro disponible): 20 g/l en todas las situaciones.

Formaldehído

El formaldehído es activo frente a todos los microorganismos, pero es menos efectivo a temperaturas por debajo de 20 °C. Se recomienda una solución de formalina al 5% en agua contra los virus.

Glutaraldehído

El glutaraldehído es activo frente a todos los microorganismos a una concentración de 20 g/l (2%). Es especialmente útil para descontaminar equipos con componentes metálicos. Antes de usarlo, hay que activar la solución mediante la adición de bicarbonato para alcalinizarla, y se debe utilizar en un período de 2 semanas. Hay que manejarlo con cuidado, y evitar el contacto con la piel, los ojos y el tracto respiratorio.

Compuestos fenólicos

Muchos de los desinfectantes comunes tienen su base en los compuestos fenólicos. Son activos frente a los hongos y las bacterias vegetativas, pero no frente a las esporas, y varían en su actividad frente a los virus.

Alcoholes

El etanol y el alcohol isopropílico tienen propiedades desinfectantes similares a concentraciones del 70-80% en agua; concentraciones mayores o menores reducen su efectividad como germicida. Son activos frente a las bacterias vegetativas y frente a los virus lipídicos, pero no frente a las esporas y los hongos. Su efecto sobre los virus no lipídicos es variable. El alcohol es especialmente efectivo cuando se mezcla con otros agentes, por ejemplo, alcohol al 80% con 100 g/l de formaldehído o con 2 g/l de hipoclorito sódico (2.000 ppm de cloro disponible).

Aplicaciones de los desinfectantes

Rutinaria

Al terminar el trabajo diario, el área de trabajo se debe limpiar con una solución de hipoclorito sódico al 1% p/v recién preparada (lejía con cloro). Las pipetas reutilizables se deben poner en remojo en una solución al 2,5% durante 30 min o más. Para limpiar una salpicadura de sangre se debe utilizar una solución al 10%. Cada día hay que preparar la solución de hipoclorito sódico diluida. Es útil añadir detergentes a la solución, ya que los desinfectantes son más activos sobre superficies limpias.

Se dispone de un producto comercial con una mezcla determinada de peróxido con surfactante y ácidos orgánicos en un sistema tampón *(«Virkon», Antec-DuPont)*. Parece ser efectivo como desinfectante general para todas las superficies duras, equipos de laboratorio de plástico y acero inoxidable, instrumentos médicos y ropa sucia; también absorbe la sangre vertida u otros fluidos corporales.

Equipos automáticos

Algunos equipos automáticos se pueden desinfectar mediante el lavado repetido con hipoclorito sódico al 10% p/v o con glutaraldehído al 20% p/v, seguido de varios lavados

Tabla 25.2. Propiedades de los desinfectantes más comunes

		Activo contra					
Reactivo	Concentración (%)[a]	Hongos	Bacterias	Micobacterias	Esporas	Virus con cubierta lipídica	Virus sin cubierta lipídica
A: Hipocloritos	1–10	+	+++	++	++	+	+
B: Compuestos fenólicos	1–5	+++	+++	++	0	+	(±)
C: Formaldehído	2–8	+++	+++	+++	+++	+	+
D: Glutaraldehído	2	+++	+++	+++	+++	+	+
E: Alcohol etílico	70–80	0	+++	+++	0	+	(±)
F: Alcohol isopropílico	70	0	+++	+++	0	+	(±)
G: Iodoformo	0,1–2	+++	+++	+++	+	+	+

[a] Véase el texto. +, ++ y +++, grado de efectividad; (±) variable, según el virus; 0, sin efectividad.

Reactivo	Inactivado por la materia orgánica	Corrosivo[a]	Irritante de la piel[a]	Irritante de los ojos[a]	Irritante respiratorio[a]
A: Hipocloritos	+++	+	+	+	+
B: Compuestos fenólicos		+	+	+	
C: Formaldehído			+	+	+
D: Glutaraldehído		+	+	+	
E: Alcohol etílico				+	
F: Alcohol isopropílico				+	
G: Iodoformo	+++	+	+	+	

[a] Aparte de estos peligros específicos, todos los desinfectantes son sustancias tóxicas.

con agua. El glutaraldehído se debe utilizar en aparatos con una superficie de metal, porque el hipoclorito origina corrosión. Algunos aparatos tienen requisitos especiales de descontaminación; hay que hacer caso siempre de las instrucciones del fabricante.

Centrífugas

Las centrífugas de los laboratorios requieren particular atención. Cualquier salpicadura de sangre se debe tratar inmediatamente, y el vaso de centrifugación, el péndulo y las cubetas (incluyendo las almohadillas de goma) se tienen que desinfectar regularmente con una solución de glutaraldehído al 2% p/v. Las centrífugas nunca se deben limpiar utilizando una solución de hipoclorito u otros agentes corrosivos del metal. Hay que tener especial cuidado cuando se rompa un tubo de cristal o de plástico en una centrífuga (tabla 25.3).

Jeringuillas y agujas

Aunque el uso de jeringuillas y agujas desechables de un solo uso está fuertemente recomendado, algunas circunstancias pueden requerir usar las reutilizables. Éstas se deben lavar a fondo en agua corriente para eliminar cualquier resto de sangre. A continuación, poner las jeringas en remojo durante al menos 30 min en lejía con hipoclorito al 10%, y remojar las agujas durante toda la noche en glutaraldehído al 2% recién diluido. Aclarar después en agua corriente y poner en remojo con agua destilada o desionizada cambiada dos veces. Por último, antes de reutilizarlas hay que esterilizarlas calentándolas en una estufa a 120 °C durante 30 min.

Guantes

Los guantes desechables no se deben reutilizar, ya que pueden contener material contaminado y se pueden deteriorar si se limpian. Los guantes domésticos de goma se pueden lavar y descontaminar si se ponen en remojo en una solución de hipoclorito al 1% durante 30 min, pero se deben descartar si presentan pinchazos o rasguños, o si muestran signos de deterioro, tales como pelarse o cuartearse.

Ropa sucia

La ropa sucia se debe situar en bolsas etiquetadas a prueba de escapes para su transporte a la lavandería, donde hay que lavar las prendas en agua caliente (>70 °C) con deter-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 25.3. Procedimiento para descontaminar la centrífuga tras la rotura de un tubo

1. Apagar el motor de la centrífuga y no abrir la tapa durante 30 min. Informar al responsable de seguridad
2. Cuando la rotura implica una muestra de alto riesgo, hay que usar guantes, protectores oculares y un delantal protector, además de abrir las cubetas en una cabina de seguridad
3. Hay que usar guantes fuertes y pinzas para quitar los tubos rotos y cualquier residuo sólido. Éstos, junto con las cubetas, los pernos y el rotor, se deben colocar en una solución de glutaraldehído al 2% p/v durante 24 h
4. El vaso de la centrífuga se debe lavar con una solución de glutaraldehído al 2% p/v; a continuación, dejarlo secar y volver a lavarlo
5. Todo el material desechable contaminado se debe colocar en contenedores apropiados para el autoclave

gente durante 25-30 min antes de ser aclarada, o como alternativa, se pueden poner a remojo en una solución de hipoclorito sódico al 1% p/v (v. pág. 556) antes de ser lavadas a mano.

ELIMINACIÓN DE RESIDUOS

La eliminación segura de los residuos de laboratorio es de suma importancia. Los desechos del laboratorio y el material contaminado representan un peligro para la salud tanto de los trabajadores del laboratorio como de la comunidad. El vertido imprudente de desechos sólidos, líquidos, químicos o biológicos también es una amenaza para el medio ambiente. La OMS tiene una página web útil (www.healthcarewaste.org) que proporciona una información actualizada acerca de varios aspectos de la gestión de los residuos, incluyendo los problemas y requisitos legales específicos de cada país y región.

Los residuos de laboratorio se clasifican en:

1. Materiales infecciosos.
2. Materiales patológicos.
3. Materiales radioactivos.
4. Sustancias genotóxicas.
5. Punzantes.
6. Productos químicos, incluyendo los vertidos de los analizadores.
7. Productos farmacéuticos.
8. Metales mesados, incluyendo pilas y termómetros rotos.
9. Contenedores presurizados.
10. General, desechos no clínicos.

La Oficina Euro Regional de la OMS[11] ha publicado un documento práctico sobre la gestión de los residuos sanitarios; este manual se puede descargar de www.healthcarewaste.org. Visitar también www.noharm.org>medicalwaste.

La sangre y otros fluidos corporales potencialmente infectados se pueden echar con seguridad en un desagüe sólo si está conectado al alcantarillado sanitario. El desagüe debe ser lavado con agua corriente inmediatamente, seguido de 250 ml de hipoclorito al 10%, y por último, otra vez con agua corriente. Si no se dispone de sistema de alcantarillas, el material se debe depositar en tanques contenedores para el calentamiento por vapor o el tratamiento químico, antes de echarlo finalmente al alcantarillado público. Los contenedores de muestras, las jeringuillas usadas, los escobillones y los tejidos se deben recoger en bolsas especiales con un código de color para su posterior incineración o paso por el autoclave, antes de echarlos al cubo de la basura. Los contenedores «para materiales punzantes» se deben incinerar sin abrir.

Las muestras altamente infecciosas requieren un manejo especial, de la siguiente manera[11]:

1. Separarlas de otros residuos potencialmente infecciosos y colocarlas inmediatamente en una bolsa o contenedor a prueba de escapes.
2. Si es posible, desinfectarlas inmediatamente con autoclave o con tratamiento químico; los residuos se pueden manejar entonces junto a otros desechos clínicos.
3. Si no se desinfectan inmediatamente, colocarlas en bolsas identificables (p. ej., amarillas) con el símbolo de biopeligroso marcado como «residuo altamente infeccioso». Se debe llevar inmediatamente a un punto de almacenamiento central para su eliminación.

La información acerca de la eliminación de ciertos productos químicos aparece en la hoja de datos de seguridad del fabricante y hay que establecer una estrategia de control de residuos, teniendo en cuenta los materiales tóxicos y carcinogénicos, las sustancias corrosivas, las sustancias inflamables y los productos químicos reactivos con riesgo de explosión. Los vertidos de los analizadores que no contengan productos químicos que puedan reaccionar con el metal de las tuberías de residuos se pueden echar directamente en el alcantarillado principal.

Los contenedores presurizados no se deben puncionar ni incinerar. Tienen que ser cuidadosamente liberados al aire libre, lejos de la gente, y después el personal debe deshacerse de ellos en contenedores de residuos no peligrosos.

Los residuos generales incluyen los domésticos, los envases y otras sustancias no peligrosas para la salud humana. Pueden ser incinerados o eliminados según las instalaciones locales.

TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

Existen estrictas normas nacionales e internacionales acerca del embalaje y el transporte de las muestras de pacien-

tes y otras sustancias biológicas por correo o por transporte aéreo, que también se aplican a los servicios de mensajería[12-14]. La International Air Transport Association (IATA) establece como requisito que las muestras vayan empaquetadas de acuerdo a las *Instrucciones de embalaje IATA 650*, que se describen en su página web.

A continuación se resumen sus requisitos:

1. Un contenedor primario precintado y a prueba de escapes.
2. Material absorbente rodeando al contenedor primario; si se empaquetan juntos varios contenedores primarios, tienen que estar envueltos individualmente para prevenir el contacto entre ellos y para asegurar un embalaje ajustado.
3. Un contenedor protector secundario (p. ej., un tubo de plástico rígido, una tabla de fibra ondulada o una caja de poliestireno). Si se va a enviar por vía aérea, el contenedor tiene que ser capaz de resistir un diferencial de presión de 95 kPa sin escapes.
4. Embalaje externo, como una caja segura de cartón rígido o de tabla de fibra, o un sobre de correo con plástico de burbujas.
5. El embalaje externo debe estar claramente identificado como «biopeligroso», junto con el símbolo universal de peligro biológico. También se aconseja añadir un aviso de que el paquete sólo debe ser abierto por una persona autorizada, preferiblemente en el laboratorio. Si se manda por vía aérea, en la etiqueta debe poner «Empaquetado de acuerdo con las instrucciones de embalaje IATA 650».
6. Cuando haya que mantener congelados el plasma o el suero, la muestra empaquetada se debe situar en un contenedor aislado rodeado de hielo seco. A la inversa, hay que tener cuidado de que no se congelen las muestras de sangre total. El contenedor también debe permitir la liberación de gas CO_2 para prevenir el aumento de la presión. Hay que comprobar las normas de cada compañía aérea en concreto para asegurarse de que el hielo seco no se considere material peligroso.

BIBLIOGRAFÍA

1. International Organization for Standardization 2003 Medical laboratories—requirements for safety: ISO 15190. ISO, Geneva.
2. International Electrotechnical Commission 2001 Safety requirements for electrical equipment for measurement, control and laboratory use: Part 1: General requirements IEC/ISO/EN 61010. ISO, Geneva. Other sections of this standard relate to particular requirements (e.g., Part 020: laboratory centrifuges; Part 081: semi-automated analyzers; Part 101 in-vitro diagnostic (IVD) medical equipment.)
3. World Health Organization 1997 Safety in health-care laboratories—Document LAB/97.1. WHO, Geneva.
4. World Health Organization 1993 Laboratory Biosafety Manual, 2nd ed. WHO, Geneva.
5. United Kingdom Health and Safety Executive 1991 Safe working and the prevention of infections in clinical laboratories. HSE Books, Sudbury, Suffolk CO10 2WA.[b]
6. National Radiological Protection Board 2002 The ionizing radiation (Medical exposure) regulations 2000. NRPB, Didcot, Oxon OX11 0RQ.
7. United Kingdom Health and Safety Executive 2002 Control of substances hazardous to health (COSHH) regulations. HSE Books, Sudbury, Suffolk CO10 2WA.
8. United Kingdom Health and Safety Executive 2000 Genetically modified organisms (GMOs) including genetically modified micro-organisms (GMMs) regulation. HSE Books, Sudbury, Suffolk CO10 2WA.
9. Holt AStJ 2000 Principles of health and safety at work, 5th ed. reprint. Institute of Occupational Safety and Health, Wigston LE18 1NN.
10. Gardner JF, Peel MM 1998 Sterilization, disinfection and infection control 3rd ed. Churchill Livingstone, London.
11. Rushbrook P, Chandra C, Gayton S 2000 Starting health care waste management in medical institutions: a practical approach. WHO/EURO/00/502187. WHO Regional Office for Europe, Copenhagen.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards 1994 Procedures for handling and transport of diagnostic specimens and etiological agents H5-A3. NCCLS, Wayne, PA.
13. United Nations 1993 Recommendations on the transport of dangerous goods, 8th ed. United Nations, New York.
14. European Committee for Standardization 1996 Transport packages for medical and biological specimens—requirements, tests EN 829. CEN, Brussels.

[b] Se puede encontrar una lista completa de las publicaciones de HSE en www.HSEbooks.com.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

26 Control de calidad

S. Mitchell Lewis y Barbara De la Salle

Preparaciones de referencia 563
Hemoglobina 563
Materiales para el control de calidad 563
Preparación del control de sangre total estabilizada 564
Preparación de sustitutos de leucocitos 565
Preparación del control de calidad para el recuento plaquetario 566
Análisis de los datos 566
Desviación estándar de los controles 566
Gráficos de control 566
Pruebas por duplicado en las muestras de los pacientes 567
Comprobación «delta» 568
Uso de los datos del paciente para el control de calidad 568
Valoración externa de la calidad 569
Análisis de los datos de EQA 569
Protocolo de garantía de calidad para los laboratorios de diagnóstico 571

El control de calidad en el laboratorio de hematología pretende asegurar unos resultados fiables de las pruebas, con el grado necesario de precisión y exactitud, como se describe en la página 538. La *exactitud* se define como la proximidad del valor estimado al considerado como verdadero. La *precisión* hace referencia a la reproducibilidad de una prueba, pero una prueba puede ser precisa sin ser exacta. La inexactitud, la imprecisión o ambas pueden ser el resultado del uso de reactivos o de estándares poco fiables, de una calibración incorrecta de los instrumentos o de una mala técnica (p. ej., una dilución constantemente incorrecta o el uso de un método que dé una reacción incompleta o no específica para la sustancia que se va a medir).

La precisión se puede controlar replicando las pruebas y repitiendo las pruebas en muestras previamente medidas. La exactitud puede comprobarse, por norma, sólo mediante materiales de referencia que hayan sido analizados por métodos de referencia.

Un programa de control de calidad incluye un control interno de la calidad, una valoración externa de la calidad y una estandarización. Debe asegurar también un control adecuado de las etapas pre y postanalítica desde la recogida de muestras (v. cap.1) hasta el envío puntual de un informe (v. pág. 543).

El *control interno de la calidad* se basa en la observación de los procedimientos de las pruebas hematológicas que se llevan a cabo en el laboratorio. Incluye la cuantificación en materiales especialmente preparados y las valoraciones repetidas en las muestras ordinarias, así como el análisis estadístico diario de los datos obtenidos de las pruebas que se llevan a cabo de manera habitual. Así se asegura la evaluación continua de la fiabilidad del trabajo del laboratorio, con la validación de las pruebas antes de que se hagan públicos los informes.

La *valoración externa de la calidad* (EQA) es la evaluación por parte de una agencia externa de las prestaciones de numerosos laboratorios a través de muestras suministradas especialmente con esta finalidad. El análisis de la prestación es retrospectivo. El objetivo es alcanzar la capacidad de comparación entre laboratorios y entre métodos, pero esto no garantiza necesariamente la exactitud, a menos que las pruebas hayan sido analizadas por un laboratorio de referencia junto a una preparación de referencia con un valor conocido. Los planes se organizan, por lo general, a nivel nacional o regional. Los planes nacionales se conocen normalmente con el nombre de NEQAS (Plan Nacional de Valoración Externa de la Calidad, del inglés *National External Quality Assessment Scheme*). Hay un plan EQA internacional organizado por la OMS, y la *Asian Network of Clinical Laboratory Standardization and Harmonization* ha establecido un plan regional, denominado Estudios Asiáticos de Garantía de Calidad (contacto: Kaplee@korea.ac.kr). Las «pruebas de aptitud» describen los procedimientos por los que funciona un plan EQA.

La *estandarización* implica tanto a los materiales como a los métodos. El *material estándar* o las *preparaciones de referencia* se usan para calibrar instrumentos de análisis y para asignar valores cuantitativos a los calibradores. Cuando sea posible, deben ser trazables para una determinada unidad de medida física o química, basada en unidades métricas de longitud (metro), masa (kilogramo), cantidad de sustancia (mol) y tiempo (segundos).

Un *método de referencia* es una técnica exactamente definida, que se usa asociada a una preparación de referencia, cuando se dispone de ella, para proporcionar datos suficientemente precisos y exactos para los propósitos científicos y para valorar la validez de otros métodos.

Un *método seleccionado* es aquel que se puede comparar directamente con el método de referencia internacional y

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

cuya validación es trazable por éste; sirve de alternativa al método de referencia cuando no se dispone de material de referencia internacional. Se debe usar para la evaluación y la validación del método (de trabajo) rutinario propuesto.

Un *método operativo* (o *recomendado*) está pensado para utilizarlo en la práctica rutinaria, teniendo en cuenta la economía del trabajo y de los materiales y la facilidad de desarrollo, y que haya demostrado ser, mediante estudios de validación con el método de referencia, suficientemente fiable para el propósito pretendido.

La principal autoridad internacional implicada en estándares de materiales (preparaciones de referencia) para la medicina de laboratorio es la Organización Mundial de la Salud. La mayoría de ellos están apoyados por el Laboratorio internacional de la OMS situado en el National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) del Reino Unido. En la Unión Europea, el Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) ha establecido numerosos estándares denominados «materiales certificados de referencia» para hematología y química clínica (v. pág. 591). Los estándares internacionales no están destinados a la práctica rutinaria, pero sirven como estándares estables para asignar valores a «estándares secundarios«» comerciales (o producidos en el laboratorio) o *calibradores*.

Los *controles* son preparaciones que se usan tanto para el control interno de calidad como para la valoración externa de la calidad. Algunas preparaciones de control tienen valores asignados (v. más adelante), pero no se deben usar como estándares, porque sus valores asignados son, por lo general, aproximaciones, siendo a menudo estables sólo por un tiempo limitado.

La estandarización de los métodos y aparatos utilizados en hematología corresponde al International Council for Standardization in Haematology (ICSH), cuyas recomendaciones se publican en las revistas de hematología. La Organización Internacional de Estandarización (ISO) y el Comité Europeo de Normalización (CEN) también han establecido estándares para la práctica médica de laboratorio y para el uso de aparatos médicos de diagnóstico *in vitro* (v. más adelante). En el Reino Unido, el British Committee for Standards in Haematology (BCSH) publica guías en libros o en artículos de revistas. En los Estados Unidos, el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (antes el National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS) ha publicado una amplia serie de guías prácticas.

Las listas de los documentos y catálogos de estas diversas organizaciones se pueden encontrar en sus páginas web. Algunas se pueden confundir con otros organismos con las mismas iniciales si no aparece el título completo:

1. *WHO:* Página de inicio > *Biologicals* > *International reference preparations* > *Catalogue*.
2. *NIBSC:* Página de inicio > *Catalogues* > *Catalogue of biological standards* > *Blood products*.
3. *IRMM:* Página de inicio > *Reference material sales* > *Catalogue* > *Clinical chemistry*.
4. *ISO:* Página de inicio > *Products* & *services* > *ISO catalogue* > *11. Health care technology* > *ISO catalogue 11.100* > *Laboratory medicine* (o identificar un estándar concreto).
5. *CEN:* Página de inicio > *TC140*.
6. *ICSH:* Página de inicio > *Publications*.
7. *BCSH:* Página de inicio > *Guidelines*.
8. *NCCLS:* Página de inicio > *Shop* > *Hematology*.

En Europa, los dispositivos de diagnóstico médico *in vitro* (IVDMD, del inglés *in vitro diagnostic medical devices*) utilizados en el laboratorio, que incluyen instrumentos y equipos, reactivos, calibradores y materiales de prueba, se controlan mediante una directiva del Consejo y del Parlamento Europeo. Se requiere que los fabricantes usen la marca de la CE en sus productos para certificar que cumplen las prestaciones que anuncian[1]. Los detalles de la directiva se encuentran en la página web de la MDA (v. tabla 24.6). Una serie de compañías también ofrecen información útil (p. ej., www.ce-marking.org). El proceso está supervisado a nivel nacional por las autoridades competentes (p. ej., en el Reino Unido por la Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency [MHRA], antes la Medical Devices Agency). Los esquemas de valoración externa de la calidad tienen su papel a la hora de identificar las prestaciones insatisfactorias de los dispositivos.

Los siguientes estándares ISO (y CEN) tienen que ver con la práctica de laboratorio y los requisitos de la directiva IVDMD; su conformidad puede ser también obligatoria en los países de fuera de Europa:

1. *Series ISO 9000 y 10000*. Un grupo de estándares que especifican diversos aspectos de los sistemas de gestión de la calidad de cualquier organización.
2. *EN ISO 15189*. Requerimientos particulares de los laboratorios médicos de calidad y aptitud. Tiene en cuenta los requerimientos de la serie ISO 9000 cuando son relevantes para la práctica médica del laboratorio; también incluye un documento suplementario acerca de las pruebas en el punto de asistencia (ISO 22870).
3. *ISO 22869*. Guía de la puesta en marcha de la ISO 15189 en el laboratorio.
4. *EN ISO 17511*. IVDMD-trazabilidad métrica de los valores asignados a los calibradores y a los materiales de control.
5. *ISO 15198*. IVDMD-validación de los procedimientos del control de calidad de los usuarios por el fabricante.
6. *EN 14136*. Utilización de esquemas externos de valoración de la calidad en la evaluación de las prestaciones de los procedimientos de examen del diagnóstico *in vitro*.
7. *Guía ISO 43*. Pruebas de control por medio de comparaciones interlaboratorios.
   a) Parte 1. Desarrollo y operativa de los esquemas de las pruebas de aptitud técnica.
   b) Parte 2. Selección y uso de los esquemas de las pruebas de aptitud por organismos de acreditación de laboratorios.

El uso de preparaciones de referencia y los principios de garantía de la calidad se describen en este capítulo. El recuento sanguíneo se usa como modelo ilustrativo. Los es-

tándares disponibles para otras pruebas se mencionan en las secciones de este libro donde están descritas.

PREPARACIONES DE REFERENCIA

Hemoglobina

La disponibilidad de una preparación de referencia internacional de cianmetahemoglobina (HiCN) ha contribuido a mejorar la exactitud de la medición de la hemoglobina[2]. En algunos países, las preparaciones que cumplen con el estándar internacional son certificadas por las autoridades nacionales apropiadas. Se puede obtener una cantidad limitada de estándar internacional de la OMS, y el IRMM ofrece un material de referencia certificado comparable (v. pág. 591). Una característica importante de este material es que es estable durante al menos varios años. En los lugares donde está prohibido el uso del reactivo cianuro para la hemoglobinometría sistemática, se puede emplear aún la cianmetahemoglobina estándar para asignar un valor de hemoglobina a las preparaciones de sangre total o lisada (v. pág. 564), el cual se usa entonces como estándar secundario local tras una dilución apropiada. La parte lisada no diluida es estable hasta 6 meses, y la sangre completa es estable durante 3 semanas aproximadamente, pero tras la dilución apenas dura unos días.

Tanto la sangre total como la lisada son útiles para la garantía de calidad de la hemoglobinometría; las muestras de referencia de sangre total se deben introducir en lotes de muestras sanguíneas, y todas las muestras se deben analizar juntas. Esto es aplicable tanto al método automático como al manual.

Células sanguíneas

Las preparaciones estándar son esenciales para la calibración de los contadores electrónicos de partículas, especialmente los sistemas automáticos que se pueden ajustar arbitrariamente. Esto significa que para obtener un resultado verdadero, el aparato debe calibrarse utilizando una preparación de referencia con valores asignados de una exactitud conocida.

La sangre natural, extraída en ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), no tiene valor como preparación de referencia debido a su corta vida en el laboratorio. Se ha intentado preservar la sangre por varios métodos sin que se afectaran los componentes del recuento sanguíneo[3,4], y se dispone de productos comerciales con sangre preservada, pero son específicos de cada equipo. La sangre se mantiene durante algunas semanas a 4 °C si se le añade ácido-citrato-dextrosa (ACD) o citrato-fosfato-dextrosa (CPD). Incluso así, el volumen corpuscular medio (VCM) disminuye ligeramente y alguno eritrocitos se lisan, de manera que no se puede utilizar la sangre como material de referencia, aunque se puede utilizar como preparación de control para comprobar la precisión y el funcionamiento fiable de un sistema de recuento celular en períodos relativamente cortos[3].

Se han hecho intentos para ofrecer partículas de tamaño adecuado en suspensiones estables como sustitutos de las células sanguíneas normales. Entre ellas están los eritrocitos fijados y las partículas esféricas de látex[5]. Las células se pueden estabilizar permanentemente por medio de la fijación (p. ej., en una solución de glutaraldehído). El glutaraldehído origina que los eritrocitos encojan de tamaño inmediatamente, y este proceso de encogimiento continúa durante 3-4 días. Después de eso, las células permanecen constantes en tamaño y forma, y el resultado del recuento celular y la distribución del tamaño celular permanecen iguales durante meses e incluso años. Por tanto, estas células fijadas se pueden usar para medir la precisión de la función de un equipo, pero debido a que se trata de discos bicóncavos e inflexibles con propiedades de flujo que difieren de las de la sangre fresca en los sistemas de análisis, no se pueden utilizar para calibrar un instrumento que analice sangre natural[6,7].

Para el recuento total de leucocitos se han utilizado con éxito dos tipos de material como materiales estándares de referencia, al menos con analizadores simples, pero es posible que estas preparaciones fijadas no sean apropiadas para su utilización con algunos sistemas modernos.

1. Leucocitos concentrados de sangre humana y fijados en la siguiente solución[8]: ácido acético glacial, 42 mg; sulfato de sodio, 7 g; cloruro sódico 7 g; y agua, hasta 1 l.
2. Eritrocitos fijados con glutaraldehído suspendidos en sangre total de mamífero libre de leucocitos[9]. La sangre de pollo o de pavo[a], cuyos eritrocitos son nucleados, es apropiada para el recuento de leucocitos totales. Diferentes especies animales pueden proporcionar células de tamaños comparables a las del recuento diferencial de leucocitos; sin embargo, otras propiedades físicas de los diferentes tipos de leucocitos no tienen un paralelismo con los materiales de referencia, de manera que dichas preparaciones no son apropiadas como estándares directos para recuentos diferenciales automatizados, basados en la identificación de las células por sus diversas propiedades físicas.

Asignación de valores

Los métodos utilizados para la asignación de valores a los materiales de referencia deben ser tan válidos y precisos como prácticos. Se han descrito métodos estandarizados de referencia para la concentración de hemoglobina (Hb), el recuento de eritrocitos (RE), el recuento de leucocitos (RL) y el hematocrito (Hto) (v. cap. 3).

MATERIALES PARA EL CONTROL DE CALIDAD

Se dispone de productos comerciales, y también se pueden hacer los controles a nivel local, aunque puede haber ciertas dificultades técnicas a la hora de preparar dichos materiales «domésticos». Por ejemplo, el plasma almacenado puede volverse turbio, los análisis serológicos o químicos

[a] Disponible comercialmente (p. ej., TCS Biosciences Ltd., Buckingham MK18 2LR, Reino Unido).

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

pueden verse afectados por la inestabilidad de las enzimas, y las reacciones inmunológicas se pueden alterar por la adición de conservantes. El recuento de sangre entraña problemas especialmente difíciles debido a la necesidad de asegurar la homogeneidad entre las muestras de partes alícuotas y la inestabilidad de las células sanguíneas, ya que los procesos que potencian la estabilidad de las muestras de sangre distorsionan el comportamiento de las células, de manera que el material control no es estrictamente análogo a la sangre fresca. No obstante, teniendo en cuenta estas dificultades, la sangre preservada o estabilizada proporciona un material apropiado para los procedimientos internos de control de calidad para la hemoglobina y el recuento de eritrocitos y leucocitos. Resulta apropiada la sangre mantenida en ACD o CPD (v. pág. 587) y pasada a través de un dispositivo de perfusión sanguínea para eliminar cualquier coágulo. Para los lisados también resulta apropiada la sangre en EDTA o heparina. Hay que tener cuidado en todas las etapas para evitar la contaminación. Siempre que sea posible, se deben utilizar materiales de vidrio y reactivos estériles, y adoptar procedimientos asépticos de manejo.

Para ayudar a mantener la esterilidad, hay que añadir al producto antibióticos de amplio espectro (p. ej., 1 mg de penicilina junto con 5 mg de gentamicina por cada 100 ml).

Cuando se usa sangre humana, hay que tratarla de la misma forma que una muestra de un paciente y, si es posible, se debería revisar para confirmar que sea negativa para la hepatitis B y C y para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Preparación de la sangre preservada

La preparación de sangre preservada comprende los siguientes pasos[9,10]:

1. Extraer sangre en un recipiente estéril (p. ej., una bolsa de donante de sangre) con anticoagulante ACD o CPD (v. pág. 587). Dejarlo durante 2-3 días a 4 °C.
2. Centrifugar la sangre durante 20 min a aproximadamente 2.000 g. Separar (y guardar) el plasma sobrenadante pero descartar la capa leucocitaria. Transferir el concentrado de eritrocitos a frascos de 500 ml.
3. Mezclar 3 volúmenes de eritrocitos con 1,5 volúmenes de NaCl, 9 g/l, centrifugar la sangre durante 20 min a aproximadamente 2.000 g y retirar el sobrenadante y la capa superior de eritrocitos por aspiración.
4. Repetir el paso 3.
5. Diluir 5 volúmenes del plasma en 2 volúmenes de NaCl, 9 g/l y añadir antibiótico.
6. Añadir el plasma diluido del paso 5 al concentrado de eritrocitos en una ratio apropiada, para obtener una preparación adecuada para utilizarla como control del recuento de eritrocitos.
7. Mezclar bien y, con mezclado continuo, depositar volúmenes de partes alícuotas en viales estériles limpios[b], y tapar bien. Mantener a 4 °C.

Asignar valores para la Hb, el RE y el Hto mediante al menos 5 mediciones repetidas, utilizando el contador con el que se llevarán a cabo las pruebas subsiguientes. Antes del análisis, mezclar la muestra en un mezclador de rodillos o a mano, continuamente, durante 5 min antes de abrirlo. El coeficiente de variación (CV) entre las pruebas no debe exceder el 2%. Comprobar la homogeneidad del reparto entre las pruebas mediante recuentos repetidos en 5 viales seleccionados al azar. Se pueden mantener los viales de sangre humana sin abrir en buenas condiciones durante unas 3 semanas a 4 °C, y la sangre de equino se puede mantener hasta 2 meses[10]. La sangre equina tiene una ventaja añadida, y es que se puede utilizar para simular sangre microcítica humana, ya que los eritrocitos de caballo tienen un VCM de aproximadamente 50 fl.

Preparación del lisado

1. Extraer sangre como se describe previamente (p. ej., en una bolsa de donante de transfusión sanguínea). La sangre de donante caducada se puede utilizar siempre que no esté lisada. Centrifugar a aproximadamente 2.000 g durante 20 min y descartar el plasma y la capa leucocitaria.
2. Añadir un volumen igual de NaCl 9 g/l, mezclar bien, traspasar a un frasco estéril y volver a centrifugar; descartar el sobrenadante. Repetir tres veces el lavado en solución salina para asegurar una eliminación completa del plasma, los leucocitos y las plaquetas.
3. A cada volumen de 10 ml de células lavadas, añadir 6 volúmenes de agua y 4 volúmenes de tolueno, tapar y agitar vigorosamente con un agitador o vibrador mecánico durante 1 h. Dejarlo a continuación toda la noche a 4 °C, para permitir que los lípidos y los restos celulares formen una superficie semisólida entre el tolueno y el lisado.
4. Al día siguiente, centrifugar a aproximadamente 2.000 g durante 20 min, eliminar las capas de lisado y almacenarlas en un frasco limpio.
5. Utilizando una aspiración de vacío suave (p. ej., mediante una bomba de agua), filtrar el lisado a través de un papel de filtro grueso (p. ej., Whatman n.º 1) en un embudo Buchner. Repetir la filtración utilizando un filtro de microporos de 0,22 µm o un papel de filtro fino (p. ej., Whatman n.º 42), cambiando el papel siempre que la filtración disminuya. Es importante no sobrecargar el embudo con el lisado.
6. A cada 70 ml del lisado, añadir 30 ml de glicerol y de antibiótico de amplio espectro (v. pág. 588). Si se necesita una Hb inferior, añadir 30% de glicerol en solución salina. Mezclar bien, repartir en contenedores estériles y tapar bien.

Asignar un valor para la Hb por el método espectrofotométrico (v. pág. 27); llevar a cabo 10 pruebas repetidas, co-

[b] Se recomienda una unidad para dispensar la mezcla como la descrita por Ward y cols.[11], para un reparto a gran escala (p. ej., para muestras NEQAS, v. pág. 569). Se puede construir utilizando utensilios de vidrio estándares, excepto por la cabeza especialmente diseñada del matraz. La información está disponible en el Department for Medical Engineering, Imperial College, Hammersmith Campus, Londres W12 0NN.

giendo muestras al azar de diversos viales del lote. El CV debe ser menor del 2%. Almacenado a 4 °C, el producto debe mantener su valor asignado como mínimo varios meses, o durante 1-2 años si se mantiene a –20 °C.

Preparación del control de sangre total estabilizada[12]

Reactivos

Formaldehído 37-40%	6,75 ml
Glutaraldehído 50%	0,75 ml
Citrato trisódico	26 g
Agua	hasta 100 ml

Método

1. Obtener sangre total en CPD o ACD. Debe ser tan fresca como sea posible, y nunca con más de 3 días de antigüedad postextracción. Filtrar a través de un filtro de sangre de 40 µm en una serie de frascos de plástico.
2. Si se necesita un recuento elevado de eritrocitos, centrifugar la sangre y eliminar parte del plasma; si se necesita un recuento de eritrocitos menor, diluir la sangre en una cantidad apropiada de plasma. Si los frascos emparejados se centrifugan con cuidado (aproximadamente 1.500 g) durante 15 min para producir capas leucocitarias, éstas se pueden manipular de una manera similar para proporcionar diferentes niveles de recuentos de leucocitos y plaquetas. Añadir antibióticos de amplio espectro (v. pág. 563) a cada muestra.
3. Mezclar bien y añadir un volumen de reactivo a 50 volúmenes de suspensión celular. Mezclar con una batidora mecánica durante 1 h a temperatura ambiente y dejar durante 24 h a 4 °C.
4. Mezclando continuamente, repartir en contenedores estériles, tapar bien y sellar con una cinta de plástico. Refrigerar a 4 °C hasta que se utilicen. Los viales sin abrir se pueden mantener a 4 °C en buenas condiciones durante varios meses.

Para analizarlas, las muestras deben mezclarse cuidadosamente con un mezclador de rodillos o a mano antes de abrirlas. Asignar valores a la hemoglobina y al recuento de células mediante al menos 5 pruebas por duplicado y comprobar la homogeneidad entre muestras con recuentos repetidos en 5 viales seleccionados al azar. El CV no debe exceder el 2%. Hay que saber, no obstante, que el Hto obtenido por centrifugación será aproximadamente un 10% mayor al obtenido por contadores automáticos.

Método simple para las preparaciones de control de calidad del recuento sanguíneo

El método descrito a continuación proporciona una preparación adecuada para el control del recuento del total de eritrocitos, leucocitos y plaquetas para algunos contadores de células sanguíneas semiautomáticos, pero no es apropiado para algunos sistemas automáticos. Debe ser estable durante aproximadamente 3 semanas si se mantiene a 4 °C.

Método

1. Extraer una unidad de sangre humana en anticoagulante CPD (v. pág. 587). Llevar a cabo el siguiente procedimiento en el plazo de 1 día tras la extracción.
2. Filtrar la sangre a través de un conjunto de recipientes de transfusión sanguínea a un frasco de cristal de 500 ml.
3. Añadir 1 ml de formaldehído fresco al 40%. Mezclar bien dándole la vuelta y dejarlo después en un mezclador de rodillos durante 1 h.
4. Dejar a 4 °C durante 7 días, mezclándolo por inversión varias veces al día. Al final de este período de almacenamiento, mezclar bien en un mezclador de rodillos durante 20 min y después, mezclándolo constantemente a mano, depositarlo en volúmenes de 2 ml en contenedores estériles.

Preparación de sustitutos de leucocitos

Los eritrocitos de pollo y pavo son nucleados y, cuando se fijan, su tamaño se encuentra dentro del rango de los leucocitos humanos reconocido por los contadores electrónicos de células. Son, por tanto, apropiados para servir como sucedáneos de leucocitos[13]. Sin embargo, dicho material puede no ser apropiado para los sistemas de recuento que se basan en tecnologías diferentes al cálculo del tamaño celular por impedancia.

Para utilizar como control de leucocitos, deben bastar 25 ml de sangre extraída en cualquier anticoagulante; tras el procesado se añade una cantidad apropiada a la sangre total conservada. Se debe mantener la esterilidad a lo largo de todo el proceso.

Método

1. Centrifugar la sangre a aproximadamente 2.000 g durante 20 min y retirar el plasma de forma aséptica.
2. Añadir un volumen igual de tampón fosfato 0,15 mol/l, pH 7,4 (v. pág. 589); mezclar y transferir a un frasco estéril de centrífuga; volver a centrifugar y desechar el sobrenadante y la capa leucocitaria.
3. Repetir el lavado y la centrifugación dos veces. A las células lavadas, añadir 10 veces su volumen de fijador de glutaraldehído (0,25% en tampón fosfato 0,15 mol/l, pH 7,4). Dejarlo toda la noche a 4 °C.
4. Al día siguiente, agitar vigorosamente para asegurar la resuspensión completa. Mezclar en una batidora mecánica durante 1 h. Para comprobar que la fijación se ha completado, centrifugar 2-3 ml de la suspensión, desechar el sobrenadante y añadir agua al depósito. Si aparece lisis, hay que reemplazar el glutaraldehído de depósito.
5. Cuando la fijación se haya completado (es decir, tras 18 h de exposición), centrifugar la suspensión a aproximadamente 2.000 g durante 10 min y desechar el sobrenadante. Añadir un volumen igual de agua al depósito de células fijadas, volver a suspender y mezclar removiendo y agitando; centrifugar de nuevo a aproximadamente 2.000 g durante 10 min y desechar el sobrenadante; repetir dos veces.
6. Volver a suspender las células fijadas a aproximadamente una concentración del 30% en NaCl, 9 g/l. Mezclar bien

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

agitando vigorosamente. Añadir antibiótico (v. pág. 563), tapar bien, sellar con un precinto de plástico y almacenar a 4 °C.

Antes de utilizarlo, dejar el vial a temperatura ambiente durante 10-20 min; volver a suspender agitando vigorosamente con la mano o en un mezclador de vórtice, hasta que no queden grumos en la base del contenedor, y mezclar después en un mezclador rotatorio durante al menos 20 min antes de abrir el vial.

Para usar como sucedáneo de los leucocitos, tras la resuspensión tal y como se describe previamente, transferir una cantidad apropiada a un volumen de sangre conservada, cuyos leucocitos se hayan eliminado pasándola a través de un filtro de leucocitos. Establecer el recuento mediante 5-10 mediciones repetidas en 3 viales, y comprobar la homogeneidad entre las muestras con recuentos en 3 viales elegidos al azar del lote. El CV no debe ser mayor del 5%. A veces, aparecen lotes insatisfactorios que deben desecharse.

Preparación del control de calidad para el recuento plaquetario[9]

Reactivos

Solución Alsever. (A) citrato trisódico, 16 g; NaCl, 8,2 g hasta 1 l con agua; (B) dextrosa, 41 g hasta 1 l con agua. Almacenar a 4 °C. Inmediatamente antes de usar, mezclar volúmenes iguales de A y B, y filtrar a través de un filtro de microporos de 0,2 µm.

Solución EDTA. K_2-EDTA 100 g/l en la solución Alsever; estable durante 6 meses a 4 °C.

Método

1. Extraer una unidad de sangre en anticoagulante ACD o CPD. Centrifugar durante 10 min a 200 g y recoger la suspensión plaquetaria en un contenedor de plástico.
2. Añadir 1 ml de la solución de EDTA. Mezclar bien y dejar a 37 °C durante 2 h, para dejar que las plaquetas se desagreguen.
3. Añadir 200 ml de glutaraldehído fijador (0,25% en tampón fosfato 0,15 mol/l, pH 7,4). Agitar vigorosamente con la mano para asegurar una distribución completa de las plaquetas, y dejarlo durante 48 h a temperatura ambiente, agitándolo ocasionalmente.
4. Centrifugar durante 30 min a 3.500 g. Lavar el depósito dos veces en solución de Alsever y, por último, volver a suspender en 15-20 ml de la solución de Alsever.
5. Realizar un recuento plaquetario grosero, para determinar la concentración aproximada, y añadir una cantidad apropiada de la suspensión a la sangre conservada (v. pág. 563). Mezclar bien durante 20 min y, mezclando continuamente, repartir en contenedores estériles. Tapar y sellar. A 4 °C, las preparaciones deben tener una vida media de 3-4 meses. Antes de usar, volver a suspenderlo agitando vigorosamente con la mano; a continuación, realizar una mezcla mecánica durante aproximadamente 15 min.

Se ha notificado un método más sencillo de preservar las plaquetas, mediante la adición de prostaglandina E_1 a la sangre con ACD, que proporciona una preparación control con una estabilidad de unos 14 días[14].

ANÁLISIS DE LOS DATOS

Desviación estándar de los controles

Un material de control lo puede preparar un laboratorio concreto como se describe previamente, o bien puede obtenerse en el mercado. Para asegurar la homogeneidad, el producto se debe repartir en viales mezclándolo continuamente; esto se realiza de forma idónea por medio de un matraz rotatorio. Con este propósito, se ha diseñado específicamente una unidad de mezcla (v. pie de página, pág. 564). La homogeneidad intertubos se debe comprobar midiendo los analitos relevantes en al menos 3 viales (aunque preferiblemente en 10), tomados al azar del lote. Sus resultados deben encontrarse dentro de 2 desviaciones estándar (DE) de 5-10 medidas repetidas de una muestra del lote. La DE se calcula como se muestra en la página 594. El cálculo del CV proporciona una forma alternativa de expresar la dispersión de los resultados. La ventaja del CV es que describe la importancia de la DE con independencia del valor medido.

Gráficos de control

El uso de gráficos de control fue aplicado por primera vez en química clínica por Levey y Jennings[15]. Se utilizan ahora extensamente en hematología tanto para procedimientos automáticos como manuales.

Muestras de la muestra de control se incluyen en cada batería de las muestras del paciente, y los resultados se comprueban en un gráfico de control. Para verificar la precisión no es necesario conocer el valor exacto de la muestra de control. Sin embargo, si su valor se ha determinado de manera fiable por un método de referencia, se puede usar también el mismo material para comprobar la exactitud o para calibrar un instrumento. Si es posible, se deben usar controles con valores altos, bajos y normales. Es aconsejable usar al menos una muestra de control por cada lote incluso si el lote es muy pequeño. Ya que se pretende que los controles simulen un muestreo al azar, se deben tratar exactamente igual que las muestras de los pacientes. Los resultados obtenidos con las muestras de control se pueden trazar en un gráfico como se describe más adelante.

El valor medio y la DE de la muestra de control se deben establecer en primer lugar, como se describe previamente, en el laboratorio donde se llevan a cabo las pruebas de las muestras. En un papel milimetrado aritmético se dibuja una línea horizontal, que representa la media (como una base) y, en una escala apropiada de cantidad y unidad, se dibujan líneas por encima y por debajo de la media, representando +2 DE y –2 DE. Se trazan las mediciones sucesivas de la muestra de control. Si la prueba es satisfactoria, los resultados secuen-

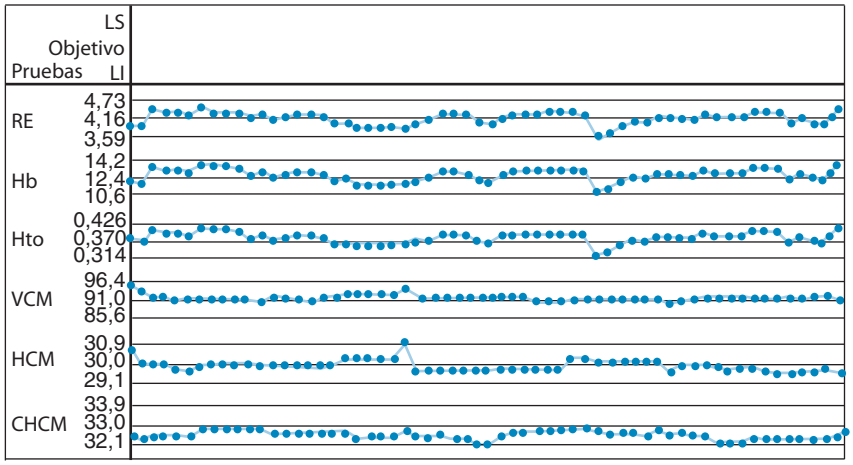


Figura 26.1. Gráfico de control (gráfico de Levey–Jennings) con un analizador del recuento sanguíneo automático. El valor medio de cada componente del recuento sanguíneo aparece a la izquierda junto con los límites superior e inferior para una prestación satisfactoria, que se ha ajustado a +2 DE y −2 DE, respectivamente.

ciales oscilan alrededor del valor medio, y menos del 5% de los resultados caen fuera de 2 DE. La figura 26.1 ilustra un gráfico de control de un sistema automático; se puede emplear un principio similar para métodos sencillos, cuyos datos se trazan de manera manual (fig. 26.2).

Lo siguiente indica un fallo en la técnica, en el instrumento o en el reactivo:

1. Un resultado muy desviado fuera de 3 DE indica un craso error o «torpeza».
2. Uno o dos resultados en, o más allá de, los límites de +2 DE o −2 DE indica un error aleatorio.
3. Diversos resultados similares consecutivos a un lado de la media indica un fallo en la calibración que origina un sesgo permanente.
4. Valores consecutivos fluctuantes subiendo y bajando en 2 DE indican una imprecisión.

El fallo puede estar en los reactivos o en los utensilios del laboratorio o puede deberse a un ajuste o calibración incorrecta del instrumento, a un error técnico o incluso a un error administrativo al transcribir los resultados. Antes de hacer una investigación exhaustiva, hay que repetir la prueba con otra muestra, y se debe considerar la posibilidad de que la incoherencia pueda ser resultado del deterioro o de la infección del lote de materiales. Es improbable que este proceso de control detecte un error en una muestra individual, ya que sólo se puede detectar mediante comprobaciones correlativas (descritas más adelante). Para una hemoglobinometría, puede ser útil emplear tanto la sangre total como la lisada para comprobar el control de calidad, porque las diferencias en los resultados obtenidos con estas dos preparaciones ayudan a identificar errores debidos a una dilución incorrecta, una mezcla inadecuada o un fallo del reactivo en conseguir una lisis completa.

Si la muestra de control se incluye en cada lote a lo largo del día, su medida no debería diferir más del CV establecido. Una tendencia de valores en aumento o descenso secuencial en medidas repetidas es indicativa de una desviación.

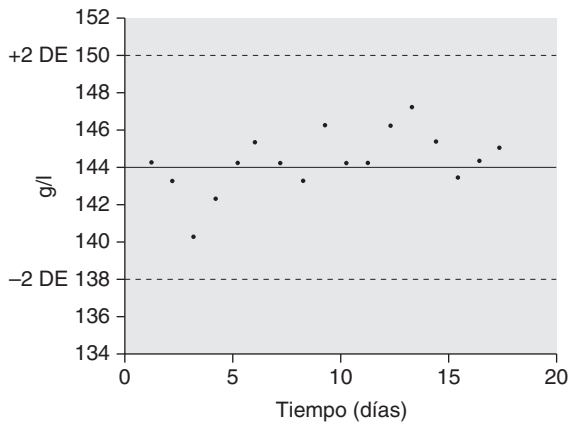


Figura 26.2. Gráfico de control para la hemoglobinometría por el método manual. Los límites para la prestación satisfactoria se han establecido en ±2 DE.

Pruebas por duplicado en las muestras de los pacientes

Las pruebas por duplicado en las muestras del paciente[16] representan otra forma de comprobar la precisión en el trabajo rutinario. Para comenzar el proceso, analizar 10 muestras consecutivas por duplicado bajo condiciones controladas. Calcular la diferencia entre los pares de resultados, y obtener la DE (v. pág. 594). Las medidas siguientes por duplicado de cualquier muestra del mismo lote no deben diferir entre ellas más de 2 DE. Este método detecta los errores aleatorios, pero no detecta una calibración incorrecta. Tampoco es sensible a la desviación gradual, la cual se puede detectar, sin embargo, si se lleva a cabo la medida por duplicado en un lote posterior, siempre que la muestra no se haya alterado durante el almacenamiento. Si la prueba se hace siempre mal o tiene un fallo inherente, la DE es amplia.

Estos procedimientos son adecuados tanto para los métodos manuales como para los automáticos; no son prácticos para los recuentos sanguíneos de rutina en un labora-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

torio con mucho trabajo, donde se deben comprobar tres o cuatro muestras de un lote de vez en cuando, como una comprobación grosera de la coherencia.

Comprobación «delta»

El recuento sanguíneo de cualquier paciente no debe diferir de sus propios recuentos obtenidos durante las 2-3 semanas previas en más de una cierta cantidad que tenga en cuenta tanto el CV de las pruebas como la variación fisiológica, siempre que la situación clínica del paciente no se haya alterado significativamente. Con los contadores automáticos, las diferencias, por lo general, no deben ser mayores del 10% para la Hb y el RE, 20% para el RL y 50% para el recuento plaquetario. Este procedimiento detecta cualquier deterioro de los aparatos y los reactivos que puedan suceder entre las pruebas.

Las pruebas también se pueden desarrollar en sangre de individuos sanos, cuyo recuento sanguíneo permanece virtualmente constante día tras día, sólo sujeto a cambios fisiológicos (v. pág. 16).

Uso de los datos del paciente para el control de calidad

En los hospitales con al menos 100 solicitudes de pruebas cada día no debería haber una variabilidad diaria significativa en las medias de su índices de eritrocitos, obtenidos por medio de un contador de sangre automático, siempre que la población de pacientes permanezca estable, y que las muestras de una fuente clínica en concreto no se procesen todas en el mismo grupo y que, por tanto, influyan desproporcionadamente en la media. Asumiendo que la población de muestras es estable, cualquier cambio significativo en las medias de los eritrocitos indicará un cambio en la calibración del instrumento o una desviación debida a un fallo en su función.

El procedimiento fue desarrollado por Bull[17,18] utilizando un algoritmo computarizado para estimar las medias diarias de los índices de eritrocitos de los pacientes (volumen corpuscular medio [VCM], hemoglobina corpuscular media [HCM] y concentración de hemoglobina corpuscular media [CHCM]). Para comenzar este programa, es necesario analizar primero muestras de al menos 300-500 pacientes con un contador de sangre automático durante varios días, y establecer las medias de HCM, VCM y CHCM. Después, usando el algoritmo, es posible analizar las muestras en lotes sucesivos de 20 muestras. Trazando estos datos en una gráfica, cualquier desviación de estos tres índices se puede reconocer fácilmente y es posible usarla para identificar fallos en los instrumentos; una DE aumentada significa pérdida de precisión. Para asegurar que cada lote es representativo, las muestras se deben escoger al azar antes del análisis y, si es posible, dentro de un lote; no deben provenir más de siete de la misma fuente clínica o tener el mismo trastorno clínico.

El método ya está incorporado a numerosos contadores de sangre automáticos (fig. 26.3). En los laboratorios que utilizan métodos manuales, se puede aplicar una simple adaptación del mismo principio limitado a la CHCM y excluyendo los resultados de cualquier situación clínica especial con probabilidad de un sesgo específico. A partir de las medias diarias de todas las mediciones durante 10 días de trabajo consecutivos se establece una media y una DE diaria global. La media de la CHCM se calcula al final de cada día. Si la prueba no varía en más de 2 DE, se considera satisfactoria, pero puede ser engañosa si hay un error en la misma dirección tanto en la hemoglobina como en el Hto. Los resultados se pueden mostrar gráficamente, como se ilustra en la figura 26.4. Es útil para validar lotes sucesivos de calibradores.

Algunos fabricantes utilizan un procedimiento similar específico del instrumento, ya que reúnen los datos enviados por los usuarios de sus aparatos a través de conexiones de red. Esto les permite mantener una comprobación constante de las prestaciones globales de estos instrumentos y detectar cualquier recalibración que se necesite o cualquier investigación de los fallos.

Comprobación de la correlación

La comprobación de la correlación implica que cualquier resultado inesperado tiene que comprobarse para ver si se puede explicar por motivos clínicos o si se correlaciona con otras pruebas. Así, por ejemplo, una hemoglobina inesperadamente alta o baja puede explicarse por una transfusión sanguínea o una hemorragia, respectivamente. Una CHCM baja se tiene que confirmar demostrando eritrocitos

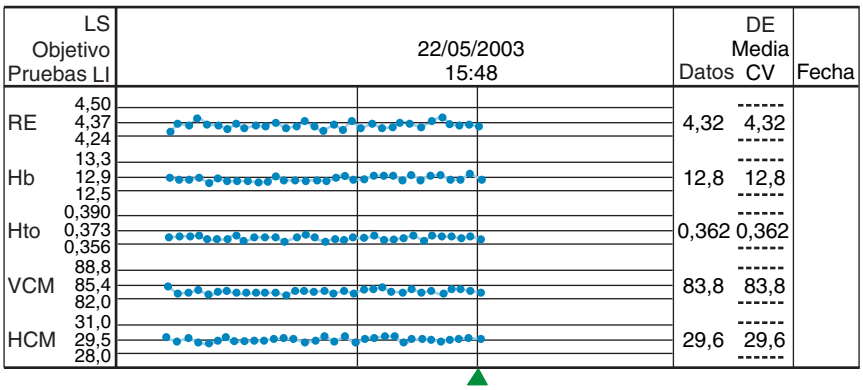


Figura 26.3. Control de calidad basado en los datos de los pacientes. Se controlan los recuentos automáticos de sangre a partir de los resultados medios de los índices de VCM, HCM y CHCM de los eritrocitos. Las medias predeterminadas se muestran junto con los límites superior (LS) e inferior (LI) para un control satisfactorio.

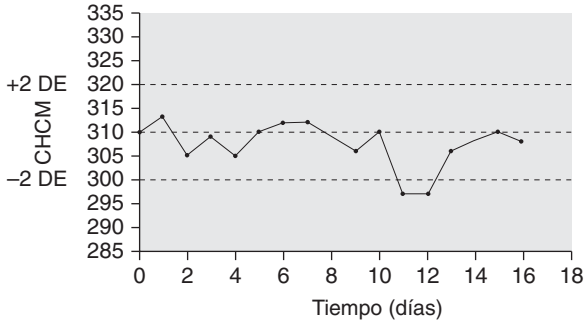


Figura 26.4. Control de calidad basado en los datos de los pacientes. Control de los recuentos manuales de sangre usando la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) como indicador.

hipocrómicos en una extensión de sangre con tinción de Romanowsky; un VCM elevado se puede correlacionar con una macrocitosis. De manera similar, hay que examinar las extensiones sanguíneas para confirmar una marcada leucocitosis o una leucopenia, una trombocitosis o una trombocitopenia, para distinguir entre plaquetas y fragmentos de eritrocitos o, por el contrario, entre plaquetas gigantes y eritrocitos de tamaño normal (p. ej. v. fig. 5.95), o para comprobar un recuento de leucocitos erróneamente alto, como resultado de eritrocitos incompletamente lisados en las hemoglobinopatías o en las hepatopatías (aunque también hay que tener cuidado con la extensión sanguínea por sí misma, ya que puede ser engañosa si no se ha hecho o se ha teñido correctamente).

El registro de los datos del recuento sanguíneo en formularios de informe acumulados o en gráficos es una buena práctica clínica y proporciona un sistema de control de calidad interno, haciendo más fácil detectar un resultado aberrante cuando se compara con unos valores basales previamente determinados. Es especialmente útil para detectar los errores descabellados ocasionales, originados por etiquetar incorrectamente las pruebas, por una suspensión inadecuada de la sangre antes del muestreo, por una coagulación parcial de la muestra sanguínea o por deterioro durante el almacenamiento. Debe dudarse de un resultado discrepante sin aparente razón clínica, hasta que se confirme mediante la repetición de la prueba en una muestra fresca. La aparición de una discrepancia similar en dos muestras diferentes en el mismo día podría sugerir que las dos muestras se han mezclado.

VALORACIÓN EXTERNA DE LA CALIDAD

Un plan de valoración externa de la calidad (EQAS)[10,19–21] es un complemento importante al control interno. Incluso tomando todas las precauciones para alcanzar la exactitud y precisión en el laboratorio, aparecen errores sólo detectables mediante una valoración objetiva externa. El principio es que se envía el mismo material desde un centro nacional o regional a numerosos laboratorios participantes, al menos 20. Los resultados que se devuelven al centro EQAS se analizan, se establece un valor objetivo y un rango aceptable alrededor de ese valor, y se juzga la prestación de cada participante en concreto. Es importante que las prospecciones se desarrollen a intervalos regulares, aunque la frecuencia puede variar, dependiendo de la importancia diagnóstica de esa prueba particular, con qué frecuencia se solicitan y su fiabilidad técnica. Así, por ejemplo, en el plan nacional (NEQAS) de hematología del Reino Unido, las muestras se distribuyen a intervalos de 4 semanas para el recuento celular y cada 3 meses para la mayoría de las otras pruebas[c].

Los principales propósitos del EQAS son asegurar un desarrollo fiable de los laboratorios individuales y alcanzar la armonización o concordancia entre los mismos. Sin embargo, algunos analizadores manejan la sangre conservada de manera diferente a las muestras rutinarias e, incluso si están bien calibrados, los distintos tipos de contador pueden diferir en sus respuestas a las muestras EQAS[22,23]. Puede hacerse necesario, por tanto, analizar los resultados por separado de los diferentes grupos de instrumentos. Cuando hay diferencias inexplicables en los recuentos de muestras EQAS con diferentes aparatos dentro de un mismo laboratorio, los recuentos se deben hacer en muestras de sangre fresca con EDTA con los diferentes aparatos, para confirmar su capacidad real de comparación, y, si fuera necesario, recalibrar alguno de ellos para alcanzar la concordancia.

Los EQAS también tienen otras funciones complementarias:

1. Recoger información acerca de la fiabilidad de métodos, materiales y equipos particulares.
2. Identificar problemas con cualquier dispositivo de diagnóstico médico *in vitro* (IVDMD) que requiera una reacción por parte del fabricante y/o un informe a la autoridad nacional responsable como se describe en la EN 14136 (v. pág. 563).
3. Proporcionar información acerca de las prestaciones requeridas para obtener una licencia o una acreditación.
4. Identificar aquellos laboratorios cuyas prestaciones ofrezcan un estándar de operativa.
5. Recomendar procedimientos actuales para varias pruebas de análisis, organizar talleres para la formación y el entrenamiento del personal del laboratorio, y dar consejos en las guías de buenas prácticas.

Análisis de los datos de EQA

Índice de desviación

La media o la mediana y la desviación estándar se calculan a partir de los resultados devueltos por los participantes. Un laboratorio concreto puede entonces comparar sus resultados en la prospección con los de otros laboratorios, y con sus propios resultados anteriores mediante el índice de desviación (ID) (o la puntuación-z, como se llama a veces). Se calcula como la diferencia entre el resultado con-

[c] La información sobre UKNEQAS está disponible en la página web www.ukneqas.org.uk (correo electrónico: haem@ukneqas.org.uk).

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

creto del laboratorio y la media o la mediana relativa a la DE. Por tanto:

$$\text{ID} = \frac{[\text{Resultados reales de la prueba} - \text{media o mediana ajustadas}]}{\text{DE ajustada}}$$

Cuando los resultados tienen una distribución gaussiana, la media y la DE se ajustan en un cálculo preliminar excluyendo todos los resultados superiores e inferiores al 5%.

Cuando la distribución de los resultados no es gaussiana, se debe usar la mediana mejor que la media. En este caso, la DE se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Extensión del 50\% central} \div 1{,}349$$

En lugar de emplear la DE ajustada como se describe previamente, la DE se puede calcular a partir de un CV constante, que tiene en cuenta la variación técnica del método, la utilidad clínica de la prueba y el rango crítico de medida para la discriminación diagnóstica.

En este método, un ID (puntuación) de menos de 0,5 denota una prestación excelente, una puntuación entre 0,5 y 1,0 es satisfactoria, y una puntuación entre 1,0 y 2,0 aún es aceptable. Una puntuación mayor de 2,0 sugiere que se debería comprobar la calibración del analizador, mientras que un ID >3,0 indica un defecto grave que requiere atención.

Monitorización consecutiva

Es esencial controlar los resultados EQA en estudios consecutivos, fijándose en cualquier fluctuación en el ID. Una forma adecuada de cuantificar esto es añadiendo 6 puntos ID recientes (p. ej., de 2 muestras en los últimos 3 estudios); cualquier valor >3,5 se redondea a la baja a 3,5 para evitar un valor aislado muy alto que tenga un efecto excesivo en el cálculo. El total se multiplica entonces por 6. Un fallo en el envío de los resultados en un estudio sufre una penalización de 50.

Una puntuación de 100 o más indica una prestación insatisfactoria persistente. Se espera, sin embargo, que los participantes corrijan cualquier problema antes de llegar a esta etapa.

Método aparte del consenso

El método «aparte del consenso», que es un refinamiento del procedimiento no gaussiano descrito previamente, se usa en el UKNEQAS para la coagulación sanguínea. Se calcula la media, y todos los resultados de los participantes se clasifican en cinco grados de la siguiente manera:

1. *Grupo A*. El 25% de todos los resultados que están inmediatamente adyacentes a la mediana y por encima, y el 25% de los que están inmediatamente adyacentes a la mediana y por debajo.
2. *Grupo B*. El siguiente 10% a cada lado de A.
3. *Grupo C*. El siguiente 5% a cada lado de B.
4. *Grupo D*. El siguiente 5% a cada lado de C.
5. *Grupo E*. El 5% final a cada lado de D (y también los no participantes).

La prestación de una prueba en concreto se valora a partir de los grados obtenidos en dos ejercicios consecutivos. Una prestación insatisfactoria aparece cuando la combinación es de D-D, E-C, E-D o E-E.

Valores diana y sesgos

Se puede asumir que los valores reales de una prueba son el resultado obtenido de la mejor prestación de los participantes seleccionados en el estudio, o por expertos utilizando métodos de referencia, o por el consenso tras el ajuste, como se describe previamente. Éste es el valor diana (VD) que deben alcanzar todos los participantes. El sesgo porcentual de los resultados de un participante en concreto se puede calcular de la siguiente manera:

$$[(\text{R} - \text{VD}) \div \text{VD}] \times 100$$

El patrón del sesgo en estudios sucesivos indicará si hay un error constante de calibración o un fallo progresivo, o bien si el defecto original ha sido corregido.

Trazado (xy) de Youden

El trazado de Youden es un método útil para relacionar mediciones en dos muestras en un estudio para proporcionar una visualización gráfica y, cuando los resultados de los participantes no sean satisfactorios, para distinguirlos entre un sesgo persistente o un error aleatorio. Los resultados de las dos muestras se trazan en los ejes horizontal *(x)* y vertical *(y)*, respectivamente, y se dibujan las desviaciones estándar (2 DE o 3 DE) de las dos series, como se muestra en resumen en la figura 26.5.

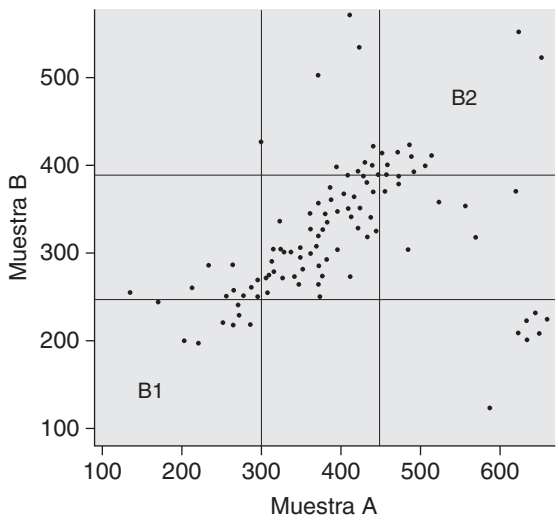


Figura 26.5. Gráfico de Youden (xy). El rango de las desviaciones estándar (DE), calculado a partir de los resultados globales con la muestra *x* y la muestra *y*, respectivamente, se dibuja en los ejes *x* e *y*; los resultados emparejados concretos se dibujan entonces en la gráfica. Los resultados del cuadrado central son satisfactorios; aquellos situados en B demuestran un sesgo persistente con medidas que son demasiado bajas (B1) o demasiado altas (B2), mientras que los resultados en otras áreas indican errores aleatorios.

Los resultados que caen en el bloque central son satisfactorios, los del bloque B indican un sesgo persistente, que puede ser positivo (a la derecha) o negativo (a la izquierda), mientras que los resultados en otras áreas indican errores debidos al azar (incoherencia) en las dos muestras.

Comprobación de la metodología

A veces es útil comprobar los componentes de un método por separado. Así, se pueden utilizar muestras apropiadas para comprobar la adecuación de la mezcla para asegurar la homogeneidad de la muestra, la fiabilidad del proceso de dilución y cómo se usa un instrumento. Por ejemplo, un estudio puede incluir un par de muestras de sangre total idénticas y de lisados de la misma muestra para medir la hemoglobina, junto con una solución de hemoglobina prediluida.

Significado clínico

Para valorar la prestación, el uso de límites basados en la DE en algunos casos es demasiado rígido y, en otros, es demasiado indulgente. Para asegurar que los resultados sean clínicamente fiables, deben estar dentro de un cierto porcentaje del valor asignado. Esto debe tener en cuenta la inevitable imprecisión del método y las variaciones normales diurnas. Los siguientes límites son adecuados para cumplir estos requisitos en la práctica:

Hb y RE (por contador de células)	3-4%
Hto, VCM, HCM, CHCM	4-5%
Recuento de leucocitos	8-10%
Recuento de plaquetas	10-15%
Vitamina B_{12}, folato, hierro, ferritina	20%
Cuantificación de HbA_2 y HbF	5%

Pruebas semicuantitativas

Las reacciones del tipo lisis, aglutinación o cambio de color se registran como 0, 1+, 2+, 3+ o 4+. La valoración de la prestación se debe basar en el grado de divergencia con respecto al valor diana, que debe ser un consenso entre los resultados de los participantes y los resultados de una revisión. Hay que tener en cuenta el significado clínico y diagnóstico de un resultado incorrecto o confuso.

Pruebas cualitativas

Para valorar las pruebas cualitativas o interpretativas (p. ej., la morfología de las extensiones de sangre), los resultados de los participantes se comparan con el consenso obtenido de un lista de expertos o por concordancia del 75% o más de los participantes. Las características informadas se clasifican según su significado clínico, teniendo en cuenta los trastornos médicos específicos, de la siguiente manera:

1. Esencial para el diagnóstico: 5 puntos.
2. Es probable que influya en la decisión diagnóstica: 2-3 puntos.
3. Podría ser útil para llegar a un diagnóstico, pero sólo como una consideración secundaria: 1 punto.
4. No proporciona información útil: 0 puntos.

A todas las observaciones correctas se les da una puntuación positiva, y las observaciones falsamente positivas se restan según la clasificación. El resultado se expresa como un porcentaje de la puntuación total posible establecida por los revisores.

PROTOCOLO DE GARANTÍA DE CALIDAD PARA LOS LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO

Los procesos que se deben incluir en un programa de control de calidad varían con las pruebas que se llevan a cabo, los instrumentos utilizados y (sobre todo si éstos incluyen un sistema de recuento completamente automatizado), la dimensión del laboratorio y el número de muestras que se maneja, los ordenadores de los que se dispone y la cantidad de tiempo que se puede dedicar al programa. Se deben rea-

Tabla 26.1. Procedimientos de garantía de la calidad

Calibración con los estándares de referencia
Instrumentos. A intervalos de 6 meses, si la gráfica de control o el EQA indica sesgo o fluctuación en los resultados, y tras cualquier reparación/servicio *Sistemas de dilución.* Al inicio y a intervalos de 1 o 2 semanas
Gráfica de control con el material de control. A diario o con mayor frecuencia con cada lote de muestras
Comprobación delta en muestras de pacientes seleccionadas. A diario
Pruebas por duplicado en las muestras de dos o tres pacientes. Si la gráfica de control o la comprobación delta muestran discrepancias
Análisis de los resultados del paciente: constancia de las medias de VCM, HCM, CHCM. A diario
Valoración de la correlación de los informes de las pruebas
Resultados acumulativos. Siguiendo las pruebas previas Extensiones sanguíneas. Si aparecen resultados de las pruebas inusuales y/o disminución en el recuento Estado clínico
Prestación del EQAS

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

lizar algunos de los formularios de control interno de la calidad, y hay que participar en un plan de valoración externa de la calidad si se dispone de él. Hay que llevar a cabo a diario algunos procesos de control, y también se tienen que hacer a intervalos apropiados otras comprobaciones de las prestaciones. Esto último es especialmente importante cuando hay un cambio en la plantilla o cuando haya habido un servicio de mantenimiento o reparación en el equipo. El protocolo extenso se resume en la tabla 26.1.

Todo el personal del laboratorio necesita formación en estos aspectos diversos de la garantía de la calidad. Un manual de formación útil de la OMS[d] describe los principios y los métodos, junto con ejercicios prácticos para ilustrarlos[9]. Otra buena fuente para la formación es la página web de J. O. Westgard (www.westgard.com); incluye la «lección del mes» y otros temas actuales que se ponen al día regularmente.

BIBLIOGRAFÍA

1. European Parliament and Council 1998 Directive 98/79 on in vitro diagnostic medical devices. Official Journal of the European Communities 331/1-331/37.
2. International Council for Standardization in Haematology 1996 Recommendations for reference methods of haemoglobinometry in human blood (ICSH Standard 1995) and specifications for international haemiglobincyanide standard, 4th ed. Journal of Clinical Pathology 49:271–274.
3. International Council for Standardization in Haematology 1988 The assignment of values to fresh blood used for calibrating automated blood cell counters. Clinical and Laboratory Haematology 10:203–212.
4. Springer W, Prohaska W, Neukammer J, et al 1999 Evaluation of a new reagent for preserving fresh blood samples and its potential usefulness for internal quality controls of multichannel haematology analyzers. American Journal of Clinical Pathology 111:387–396.
5. Lewis SM, England JM, Rowan RM 1991 Current concerns in haematology 3: blood count calibration. Journal of Clinical Pathology 44:881–884.
6. Richardson Jones A 1982 Counting and sizing of blood cells using aperture-impedance systems. In: van Assendelft OW, England JM (eds) Advances in hematological methods: the blood count. CRC Press, Boca Raton, FL, Ch 5.
7. Thom R 1972 Hemocytometry: method and results by improved electronic blood-cell sizing. In: Izak G, Lewis SM (eds) Modern concepts in hematology. Academic Press, New York, p. 191–200.
8. Torlontano G, Tata A 1972 Stable standard suspension of white blood cells suitable for calibration and control of electronic counters. In: Izak G, Lewis SM (eds) Modern concepts in hematology. Academic Press, New York, p. 230–234.
9. Lewis SM 1998 Quality assurance in haematology: document LAB/98.4. World Health Organization, Geneva.
10. Deom A, El Aouad R, Heuck CC, et al 2000 Requirements and guidance for external quality assurance programmes for health laboratories: document LAB/2000. World Health Organization, Geneva.
11. Ward PG, Chappel DA, Fox JGC, et al 1975 Mixing and bottling unit for preparing biological fluids used in quality control. Laboratory Practice 24:577–583.
12. Reardon DM, Mack D, Warner B, et al 1991 A whole blood control for blood count analysers, and source material for an external quality assessment scheme. Medical Laboratory Sciences 48:19–26.
13. International Council for Standardization in Haematology 1994 Reference method for the enumeration of erythrocytes and leucocytes. Clinical and Laboratory Haematology 16:131–138.
14. Zhang Z, Tatsumi N, Tsuda I, et al 1999 Long-term preservation of platelet count in blood for external quality control surveillance using prostaglandin E1. Clinical and Laboratory Haematology 21:71.
15. Levey S, Jennings ER 1950 The use of control charts in the clinical laboratory. American Journal of Clinical Pathology 20:1059–1066.
16. Cembrowski GS, Lunetsky ES, Patrick CC, et al 1988 An optimized quality control procedure for hematology analyzers with the use of retained patient specimens. American Journal of Clinical Pathology 89:203–210.
17. Korpman RA, Bull BS 1976 The implementation of a robust estimator of the mean for quality control on a programmable calculator or a laboratory computer. American Journal of Clinical Pathology 65:252–253.
18. Smith FA, Kroft SH 1996 Exponentially adjusted moving mean procedure for quality control: an optimized patient sample control procedure. American Journal of Clinical Pathology 105:44–51.
19. Lewis SM 1995 External quality assessment. In: Lewis SM, Koepke JA (eds) Haematology laboratory management and practice. Butterworth Heinemann, Oxford, Ch 19.
20. International Council for Standardization in Haematology 1998 Guidelines for organization and management of external quality assessment using proficiency testing. International Journal of Haematology 68:45–52.
21. International Organization for Standardization 1997 Guide 43–1 Proficiency testing by interlaboratory comparisons. I Development and operation of proficiency testing schemes. ISO, Geneva.
22. Wardle J, Ward PG, Lewis SM 1985 Response of various blood counting systems to CPD-A1 preserved whole blood. Clinical and Laboratory Haematology 7:245–250.
23. Leyssen MHJ, DeBruyere MJG, van Druppen et al 1985 Problems related to CPD preserved blood used for NEQAS trials in haematology. Clinical and Laboratory Haematology 7:239–243.

[d] Disponible, resumido, en el Department of Essential Health Technology, OMS, 1211 Ginebra 27, Suiza.

27 Hematología en laboratorios de recursos escasos

Imelda Bates y Barry Mendelow

Introducción: tipos de laboratorio 573
Organización de los servicios de laboratorio clínico 574
- Nivel A. Instalaciones en barrios incluyendo centros de salud 574
- Nivel B. Hospitales de distrito 574
- Nivel C. Hospitales centrales y universitarios 574

Disponibilidad de pruebas en cada nivel 574
- Nivel A 575
- Nivel B 575
- Nivel C 575
- Microscopios 575

Pruebas hematológicas «esenciales» 575
- Coste por prueba 576
- Fiabilidad diagnóstica 576
- Utilidad clínica 576

Mantenimiento de la calidad y fiabilidad de las pruebas 576
- Control de calidad del método de una prueba (calidad técnica) 576

Pruebas hematológicas básicas 577
- Medición de la hemoglobina 577
- Aparatos de medición de hemoglobina de lectura directa 577
- Escala de color de la hemoglobina 577
- Hematocrito 578
- Recuento celular manual mediante cámaras de recuento 578
- Recuento leucocitario total 578
- Recuento plaquetario 580
- Morfología de la sangre periférica 582
- Prueba de fragilidad osmótica modificada (prueba en un tubo) 582
- Prueba de detección de la hemoglobina E 582

Servicios de laboratorio para el manejo de VIH/sida: recuento de células T CD4 positivas 582
Gestión del laboratorio 583
Comunicación entre laboratorios 583
- Transporte de muestras 583
- Formación del personal 583
- Interacción del personal clínico 583
- Salud y seguridad 584

INTRODUCCIÓN: TIPOS DE LABORATORIO

En la mayoría de los países existen probablemente algunos laboratorios con recursos limitados, pero en los países de escasos recursos hay muy pocos laboratorios con técnicos altamente cualificados y equipamiento sofisticado; en estos países no es raro que las pruebas de laboratorio las lleven a cabo enfermeras y celadores en los despachos de consulta de pacientes ambulatorios, pasillos y centros de salud rurales. El personal escaso, el desánimo, los equipos inadecuados y el abastecimiento errático son problemas crónicos de los laboratorios de los países pobres y estos factores tienen un impacto importante en la gama y la calidad de los servicios que pueden ofrecerse. Muchos de los laboratorios más pequeños son multifuncionales y realizan hematología, parasitología, bioquímica clínica y pruebas microbiológicas. En las instituciones más grandes normalmente existe un servicio de transfusiones sanguíneas y, al menos que haya un servicio nacional de hematología, el personal de laboratorio será responsable de la selección de donantes, la recogida de sangre y la evaluación de la misma. Si no se organizan laboratorios de salud pública, se requerirá que los laboratorios asistenciales proporcionen datos de elevada calidad de vigilancia de la salud para el seguimiento epidemiológico y de salud pública.

En algunos países de escasos recursos las dificultades se agravan por el hecho de que los servicios de salud están saturados por las crecientes epidemias de VIH/sida (virus de la inmunodeficiencia humana/síndrome de inmunodeficiencia adquirida), tuberculosis y malaria. El diagnóstico y seguimiento de estas enfermedades requieren un sistema de laboratorios riguroso y fiable. Así, el diagnóstico de la malaria debe confirmarse mediante una prueba de laboratorio, porque otras enfermedades pueden parecerse clínicamente a la malaria[1]. El diagnóstico de tuberculosis puede requerir un aspirado y cultivo de médula ósea, así como un examen de biopsia por trepanación, especialmente en los pacientes que son también VIH positivo, porque en estos casos las pruebas de esputo para organismos ácidorresistentes son frecuentemente negativas[2]. El seguimiento de la progresión

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

a sida y de la efectividad de la terapia antirretroviral requiere determinaciones de hemoglobina, recuento de linfocitos CD4 positivos y determinaciones de carga viral en el plasma[3-5].

El propósito de este capítulo es apuntar hacia la dotación de un servicio de hematología efectivo a pesar de las serias limitaciones. En la planificación de este servicio es necesario identificar qué instalaciones se necesitan y planificar una red de referencia en el caso de que un problema clínico necesite una investigación que supere las instalaciones y la capacidad local. Así, por ejemplo, el manejo exitoso de los tumores hematológicos en los países de escasos recursos podría implicar a hematólogos locales entusiastas asociados con instituciones de países desarrollados, con la consiguiente adaptación de los protocolos estándar y la mejora de las instalaciones locales con aportaciones solidarias[6].

ORGANIZACIÓN DE LOS SERVICIOS DE LABORATORIO CLÍNICO

En los países de escasos recursos, los servicios de laboratorio clínico pueden clasificarse en tres niveles de acuerdo a su dimensión, dotación de personal y trabajo que asumen. Existen: *a)* instalaciones de barrios incluyendo los centros de salud; *b)* hospitales de distrito, y *c)* hospitales centrales, regionales y universitarios (fig. 27.1).

Nivel A. Instalaciones en barrios incluyendo centros de salud

Generalmente, los «laboratorios» de nivel A proporcionan los medios para determinar si un paciente debería ser remitido a un hospital local. Esto podría consistir simplemente en la determinación de la concentración de hemoglobina (Hb) durante la consulta clínica (es decir, una prueba de diagnóstico inmediato) o puede realizarse en una habitación anexa donde, a menudo, las pruebas de laboratorio las realizan enfermeras, auxiliares o celadores sin formación técnica. El equipo hematológico disponible podría incluir un método simple para la determinación de hemoglobina y un microscopio para el examen de un frotis para tuberculosis o malaria. Sin embargo, el mantenimiento de los microscopios en las áreas rurales suele ser deficitario, lo que puede comprometer significativamente la calidad de los resultados (v. pág. 601).

Nivel B. Hospitales de distrito

Los laboratorios de los hospitales de distrito son habitualmente multiuso y realizan pruebas microbiológicas y bioquímicas, así como hematológicas. El personal de laboratorio consiste en uno o dos técnicos con formación, ayudados por auxiliares que, a menudo, tienen poca o ninguna formación. El equipo mínimo disponible para hematología es un microscopio y una centrífuga y, quizás, un colorímetro para medir la concentración de hemoglobina.

Nivel del laboratorio	Servicios hematológicos realizados
Centros de salud	Cálculo simple de hemoglobina
	Detección del paludismo
	Prueba de VIH
Hospitales de distrito	Medición de la hemoglobina
	Examen de frotis sanguíneos (morfología y recuento leucocitario diferencial)
	Recuento plaquetario y leucocitario total
	Detección de hemoglobina de drepanocitosis (si procede)
	Prueba rápida del paludismo
	Recuento de CD4
Hospitales centrales/ regionales	Recuento sanguíneo automático
	Detección de G6PD
	Electroforesis de la hemoglobina
	Inmunofenotipificación
	Cálculo de la carga viral VIH
	Pruebas básicas de coagulación
	Control de anticoagulantes orales
	Procesamiento de aspirados de médula ósea
	Pruebas de histocompatibilidad cruzada y detección de anticuerpos
	Producción de componentes sanguíneos básicos
Centro nacional de referencia	Todas las pruebas relevantes

Figura 27.1. Redes de laboratorios.

Nivel C. Hospitales centrales y universitarios

A este nivel, el personal de laboratorio recibe una formación multidisciplinaria y cada laboratorio generalmente tiene un director técnico especialista, en tanto que la mayoría del personal más antiguo habrá recibido formación de posgrado en la disciplina escogida. El equipamiento generalmente incluye centrífugas, colorímetros, microscopios, equipos de electroforesis de hemoglobina y posiblemente centrífugas de banco de sangre para la separación de sus componentes. En estos laboratorios pueden encontrarse analizadores automáticos de hematología. En muchos casos, éstos habrán sido suministrados por agencias donantes, pero con frecuencia se carece de fondos a largo plazo para la ayuda al mantenimiento y la formación para utilizar estos sistemas y, consecuentemente, podrían ser poco fiables o no usarse, debido a la escasez de reactivos apropiados y al inadecuado mantenimiento y formación del personal.

DISPONIBILIDAD DE PRUEBAS EN CADA NIVEL

En los países de escasos recursos, las pruebas de hematología que están disponibles en los distintos niveles de asistencia sanitaria son muy variables y dependen de las necesidades clínicas locales, los equipos disponibles, el número

de personal de laboratorio y su cualificación técnica. A continuación se hace una descripción general de las pruebas que probablemente se requieran, aunque no necesariamente todas pueden estar disponibles en los niveles especificados.

Nivel A

- Determinación de hemoglobina por un método simple (v. pág. 577).
- Detección de malaria en gota gruesa y fina de sangre periférica (v. pág. 61).
- Pruebas serológicas de VIH apoyadas por asesoramiento y análisis voluntarios.

Nivel B

- Determinación de hemoglobina (v. pág. 24).
- Morfología de sangre periférica, especialmente para identificar la causa de anemia (v. cap. 5)[a].
- Recuento plaquetario y leucocitario total (v. pág. 578).
- Recuento leucocitario diferencial (v. pág. 32).
- Recuento de linfocitos CD4 (v. pág. 582; v. también página 288).
- Detección de malaria por frotis de sangre periférico grueso y fino (v. pág. 61) o pruebas inmunológicas rápidas para *Plasmodium falciparum* y posiblemente otras especies (v. pág. 518).
- Prueba de detección de la hemoglobina causante de anemia drepanocítica en áreas en las que ésta es relevante (v. pág. 252).

Nivel C

Además de las pruebas realizadas en el nivel B, los servicios de hematología ofrecidos por el nivel C podrían incluir los siguientes:

- Medición automática de Hb, VCM, HCM, CHCM, recuento plaquetario y recuento leucocitario total y diferencial (v. pág. 32).
- Electroforesis de hemoglobina o cromatografía fina de alta resolución (v. cap. 12).
- Cuantificación de hemoglobina A_2 y hemoglobina F (v. págs. 255 y 259).
- Detección de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) (por mancha fluorescente o método de reducción de metahemoglobina) (v. pág. 187).
- Determinación del fenotipo inmunológico por citometría de flujo (v. cap. 14).
- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros métodos para el diagnóstico de mutaciones asociadas a tumores hematológicos (v. cap. 21).
- Determinación de carga viral plasmática de VIH.
- Tinción de frotis de médula ósea para evaluación morfológica (v. pág. 102) y evaluación de los niveles de hierro (v. pág. 267).
- Examen de la médula ósea por biopsia (v. pág. 108).
- Determinación del grupo sanguíneo y pruebas cruzadas (v. cap. 20).
- Identificación de anticuerpos del grupo sanguíneo (v. cap. 19).
- Pruebas básicas de coagulación (tiempo de protrombina, tiempo de trombina y tiempo de tromboplastina parcial activado) (v. pág. 342).
- Control de anticoagulantes orales (v. pág. 399).
- Separación de la sangre total en concentrados celulares, plasma y, ocasionalmente, plaquetas (v. pág. 564).

[a] Existe un banco de ayuda disponible sobre morfología de la Organización Mundial de la Salud (OMS)[7].

Microscopios

El microscopio es la pieza más importante del equipo de laboratorio en los países de escasos recursos. Es esencial para el diagnóstico de la anemia, la tuberculosis, la malaria y otras infecciones parasitarias, así como para realizar el recuento celular absoluto y diferencial. La evaluación fiable de estas características morfológicas requiere que esté limpio y correctamente montado con las lentes alineadas y luz directa o reflejada para asegurar la obtención de imágenes claras y con magnificación elevada. Si no se realiza un buen mantenimiento del microscopio para garantizar su correcto funcionamiento mediante controles rutinarios y revisiones técnicas periódicas, ello puede conducir a diagnósticos imprecisos y a un uso ineficaz del tiempo del técnico[8,9]. El mantenimiento rutinario del microscopio se describe en la página 601.

PRUEBAS HEMATOLÓGICAS «ESENCIALES»

A pesar del coste relativamente alto del funcionamiento del servicio de laboratorio y el bajo presupuesto para asistencia sanitaria *per capita* en los países de escasos recursos, existen muy pocos datos disponibles en los que basar las decisiones racionales sobre las pruebas de laboratorio «esenciales»[10,11]. En muchos de estos países las decisiones sobre los laboratorios las realizan a nivel central los planificadores de la asistencia sanitaria, cuyos intereses son más amplios que los del director del laboratorio, pero es importante asegurar que se respete el punto de vista del director del laboratorio. Para decidir qué pruebas son «esenciales», es importante tener información fiable acerca de las necesidades clínicas y de salud pública de la comunidad local y colaborar con los planificadores sanitarios en el pronóstico de las tendencias a medio y largo plazo. La necesidad de esta información es especialmente urgente en los países donde la epidemia del VIH/sida ha supuesto una carga insoportable para los servicios de salud.

Para asegurar el coste-efectividad de los servicios de laboratorio, deberían eliminarse las pruebas que no demuestren utilidad e introducirse nuevas pruebas sobre las que existan evidencias independientes de su efectividad, como se describe en el capítulo 24, página 537. Para los labora-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

torios sin acceso a sistemas de datos informatizados, se puede obtener un índice realista de coste-efectividad mediante la siguiente fórmula, que tiene en cuenta varios factores[3]:

$$\frac{A \times 100}{C} \times \frac{100}{B}$$

donde A = coste por prueba; B = su fiabilidad diagnóstica, y C = su utilidad clínica.

Sin embargo, en los laboratorios con instalaciones limitadas, estos factores deben ser interpretados con precaución, porque no es posible elaborar una lista de pruebas que sea aplicable a todos los países o incluso a diferentes regiones de un mismo país. Deberían tenerse en cuenta los siguientes aspectos.

Coste por prueba

A menudo el coste de una prueba se calcula a partir del precio de los reactivos dividido entre el número de pruebas realizadas. Sin embargo, esto simplifica en exceso la situación y no es lo bastante preciso para constituir la base para las decisiones políticas nacionales y la asignación del presupuesto. Los factores que se necesita tener en cuenta, cuando se calcula el coste anual total de un laboratorio, incluyendo una fórmula para calcularlo, se describen en la página 537. Como ejemplo del efecto de varios factores en el coste, en el laboratorio de un hospital de distrito típico en África, la microscopia de malaria y tuberculosis constituyen el 22 y 46%, respectivamente, del número de pruebas realizadas, pero cuando estos factores se tienen en cuenta, el frotis para tuberculosis supone el 43% del presupuesto del laboratorio y la microscopia para malaria, el 9%[11].

Fiabilidad diagnóstica

La calidad de las pruebas llevadas a cabo por un laboratorio debería evaluarse regularmente; los sistemas para realizarlo están bien establecidos (v. cap. 24). La calidad de la prueba influirá en su utilidad. Por ejemplo, si el resultado de una prueba en la práctica rutinaria es sólo correcto el 80% de las veces, 1 de cada 5 pruebas será desaprovechada, reduciendo la efectividad de la prueba en un 20%. Además, la prueba incorrecta puede provocar que un paciente reciba un tratamiento inadecuado. También es importante conocer la sensibilidad y especificidad de la prueba y su valor predictivo, como se calcula en la página 537. Sin embargo, en muchos países de escasos recursos es difícil establecer estas estadísticas porque se carece del «patrón oro» de los servicios diagnósticos, necesario para determinar los valores «verdadero positivo» y «verdadero negativo».

Utilidad clínica

La evaluación de la utilidad clínica de una prueba debería ser llevada a cabo por un clínico independiente que esté familiarizado con las enfermedades locales y los servicios de apoyo diagnóstico disponibles. Este asesor necesita comparar la práctica clínica actual con la «mejor práctica» localmente aceptada o, si están disponibles, con guías locales. El porcentaje de veces que se sigue la práctica ideal puede calcularse de la observación de una variedad de interacciones clínicas. Por ejemplo, la guía de transfusiones puede recomendar que se hagan transfusiones rutinariamente a niños con Hb inferior a 5 g/dl. El asesor puede registrar cuántos niños con Hb por debajo de este nivel no recibieron transfusión y cuántas transfusiones se administraron sin esperar los resultados de Hb o con concentraciones inapropiadas de Hb. Para cada prueba el asesor necesita juzgar si ha sido apropiadamente pedida y si se emplea para influir en el manejo del paciente o en decisiones de salud pública. El porcentaje de pruebas que no se emplean para orientar las decisiones clínicas proporcionará una cifra para «pérdidas clínicas» de la prueba, que puede introducirse en la fórmula (v. pág. 576).

MANTENIMIENTO DE LA CALIDAD Y FIABILIDAD DE LAS PRUEBAS

Paradójicamente, en los laboratorios de escasos recursos, donde el equipamiento y los suministros son limitados y la formación y supervisión pueden ser mínimas, es donde se necesita que el nivel de aptitudes y la motivación, requeridas para mantener la calidad del servicio, sean más elevados. Incluso los laboratorios más básicos deberían asegurar que los procedimientos estén en orden para controlar la calidad (v. cap. 26). Además, para controlar la calidad técnica de cada prueba, la calidad del servicio completo debe asegurarse tanto dentro del laboratorio (control interno) como entre los laboratorios (control externo). Debería existir un borrador de los procedimientos operativos habituales (v. pág. 547) de todos los métodos. Además, para mantener técnicas estandarizadas, hay excelentes recursos de enseñanza y seguimiento de estos procedimientos con mínimos errores. Éstos necesitan ser regularmente revisados y puestos al día, para mantenerse al ritmo de los desarrollos técnicos y los cambios en las circunstancias locales (p. ej., disponibilidad de reactivos, limitaciones técnicas, etc.).

Control de calidad del método de una prueba (calidad técnica)

Los métodos para el control de varias pruebas hematológicas se describen en el capítulo 26, pero algunos pueden necesitar adaptación a las circunstancias locales específicas de los países de escasos recursos. Por ejemplo, cada lote de pruebas de detección de drepanocitosis debería incluir controles positivos y negativos; para controlar la constancia de la medida de la hemoglobina, pueden medirse varias veces en el día una muestra con valor elevado y otra con valor bajo.

Control de calidad interno

El control de calidad interno es un sistema del laboratorio individual para asegurar que el proceso completo de la

prueba, más que sólo el elemento técnico, es de calidad aceptable. El control de la calidad mediante el uso de controles que se emplean en el proceso completo, con los que se traza una gráfica de control (v. pág. 566), realzará los problemas con el sistema. Por ejemplo, un recuento leucocitario diferencial impreciso puede indicar problemas en la recogida y el manejo de la muestra, la preparación del portaobjetos, la fijación y el teñido, las interpretaciones morfológicas y la calidad del microscopio, así como una técnica de microscopia inadecuada. Algunas medidas, como la introducción de procedimientos operativos estándar, la formación en el servicio y un programa de mantenimiento de los equipos, están diseñadas para mejorar el rendimiento y prevenir problemas.

Evaluación externa de la calidad

Los principios de la evaluación externa de la calidad (EQA) se describen en la página 569. Las malas comunicaciones y medios de transporte pueden hacer difícil el establecimiento de EQA en los laboratorios de escasos recursos. Aunque la participación en un sistema de evaluación externo de la calidad internacional o nacional, o incluso locorregional, puede estar por encima de las posibilidades de un pequeño laboratorio rural, debería ser posible para ellos vincularse con instalaciones vecinas. Los laboratorios rurales pueden aprovechar los programas con el establecimiento de comunicaciones entre los distritos para el intercambio de materiales y resultados entre diferentes laboratorios. Estos programas podrían incluir visitas de supervisión de un delegado médico de distrito o programas nacionales verticales, tales como el control de la tuberculosis o visitas de educación sanitaria. Si un laboratorio rural detecta un problema con sus resultados, necesita tener un sistema de informes claramente definido a una instalación de un nivel más elevado, que se convierte en responsable para tratar el problema. Pueden establecerse programas de acreditación (v. pág. 547), tanto nacionales como locales, para laboratorios oficialmente reconocidos que están funcionando bien y para ayudar a los que no lo están haciendo.

PRUEBAS HEMATOLÓGICAS BÁSICAS

Medición de hemoglobina

En el capítulo 3 se describen varios métodos para la medida de la concentración de hemoglobina. El método más preciso, que puede estar disponible en los países de escasos recursos, es el método de la hemoglobina-cianuro (cianometahemoglobina). Sin embargo, éste requiere una fuente de energía y considerable habilidad técnica para llevar a cabo diluciones precisas y para preparar la curva estándar.

Los métodos para medir la hemoglobina que son rigurosos, precisos y pueden emplearse por trabajadores sanitarios no cualificados se describen a continuación.

Aparatos de medición de hemoglobina de lectura directa

Sistema de hemoglobina sanguínea HemoCue[b]

El sistema de hemoglobina sanguínea HemoCue (v. pág. 28) es una máquina portátil de lectura directa que funciona con batería o electricidad, que utiliza cubetas desechables para reacciones en seco. Es preciso y exacto (siempre que sólo se usen las cubetas especificadas) y, a diferencia de la mayoría de los sistemas, no requiere dilución previa de la muestra. Aunque el uso de cubetas desechables de un sólo uso, hace este método relativamente caro, es muy simple de usar por lo que el coste puede compensarse por el ahorro en formación y supervisión.

Aparato de medida de hemoglobina DHT[c]

El aparato de medida de hemoglobina DHT (v. pág. 28) es una máquina portátil, que funciona con batería o electricidad, de lectura directa. Se ha diseñado expresamente para su uso en países tropicales pobres. Utiliza un líquido diluyente estable y económico, y tiene un consumo energético bajo. Es simple de usar, porque la muestra diluida se coloca en una cubeta que se introduce en la máquina. Esto, automáticamente, inicia la lectura y visualización del valor de la hemoglobina.

Escala de color de la hemoglobina[d]

En el pasado, se desarrollaron muchos métodos de comparación del color, pero éstos se han quedado obsoletos, porque los colores no eran suficientemente comparables para la sangre o no eran duraderos. Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha desarrollado una escala de color de la hemoglobina de bajo coste, para la detección de la anemia donde no hay laboratorio[12,13]. Consiste en una serie de tonalidades de color impresas que representan los niveles de hemoglobina entre 4 y 14 g/dl. Se compara el color de una gota de sangre, recogida en un tipo específico de matriz, con el de la gráfica (fig. 27.2). Pretende detectar la presencia de anemia y estimar su gravedad en incrementos de 2 g/dl (20 g/l). Se ha demostrado la utilidad de la escala en la práctica clínica mediante estudios de campo en clínicas rurales antenatales y centros de salud periféricos[14,15]. Sin embargo, se debe tener cuidado en seguir exactamente las instrucciones porque la iluminación escasa, que permite secarse a la gota de sangre, y la utilización de un tipo de matriz incorrecto para las tiras de prueba pueden tener efectos negativos sobre el resultado[e].

[b] Disponible de HemoCue AB, Box 1204, SE-262 23, Angelholm, Suecia. Tel: +46 431 45 82 00.
[c] Disponible de Developing Health Technology, Bridge House, Worlington Road, Barton Mills, IP28 7DX, Reino Unido. Tel: + 44 1603 416058.
[d] Disponible de Copack GmbH, AmKrick 9, 22113 Oststeinbek, Alemania, correo electrónico: info@copackservice.de
[e] Puede obtenerse información sobre la escala de color de Hb en: Department of Essential Health Technology, OMS, 1211 Ginebra 27; Fax: +41 22 791 4836. Véase también tabla 24.6, pág. 544.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

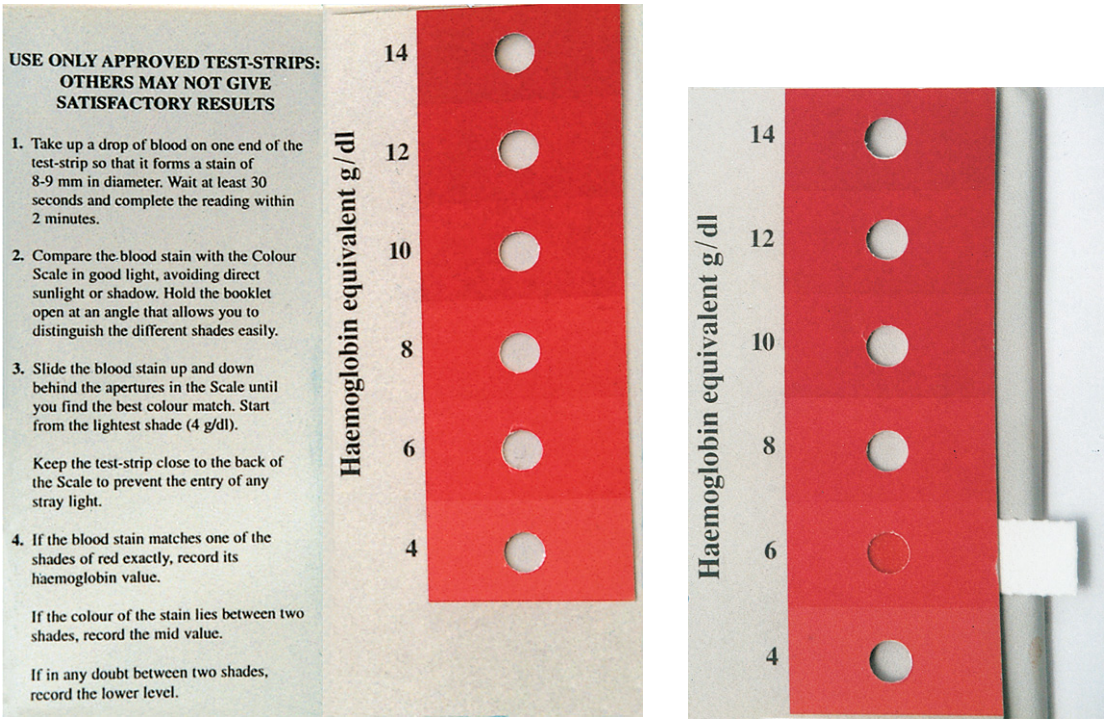


Figura 27.2. Escala de color de la hemoglobina. La tira reactiva teñida que se lee a la derecha indica una anemia grave con un valor de hemoglobina de alrededor de 6 g/dl.

Hematocrito

Aunque el hematocrito puede utilizarse para una detección simple de anemia y como una guía aproximada de la precisión de la medición de la hemoglobina, no es un sustituto para una determinación de la hemoglobina correctamente realizada. Además de los problemas técnicos enumerados en la página 28, existe un problema particular con este método en un marco de escasos recursos que puede conducir e errores en el cálculo del hematocrito. La falta de un aparato de mezclado mecánico quiere decir que las muestras pueden estar inadecuadamente mezcladas. La falta de un precinto de alta calidad para los tubos de microhematocrito implica que a menudo se desbordan durante la centrifugación. Debido a que los tubos de microhematocrito son difíciles de etiquetar, las muestras pueden mezclarse en la centrífuga, especialmente cuando la presión de trabajo es elevada y no existe supervisión. El suministro eléctrico errático, la falta de aparatos para medida de la fuerza g y el escaso mantenimiento de los equipos condiciona una centrifugación inadecuada con incompleto empaquetado de los glóbulos rojos.

Recuento celular manual mediante cámaras de recuento

El recuento visual de las células sanguíneas es una alternativa aceptable al recuento electrónico leucocitario y plaquetario. No se recomienda para el recuento rutinario de glóbulos rojos, porque el número de células que se pueden contar en un tiempo razonable en el laboratorio rutinario (p. ej., alrededor de 400) es demasiado escaso para asegurar un resultado preciso (v. más adelante).

Cámaras de recuento

La visibilidad de las divisiones en la cámara de recuento[16] es tan importante como la precisión de la calibración, por lo que se recomiendan las cámaras con una superficie «metalizada» y las de Neubauer o Neubauer mejoradas rayadas. Éstas tienen nueve áreas cuadriculadas de 1 × 1 mm, que cuando se cubren correctamente con un cubreobjetos grueso especial, contienen cada una un volumen de 0,1 µl de sangre diluida (figs. 27.3 y 27.4). Los cubreobjetos diseñados para montar las preparaciones microscópicas no deben usarse con las cámaras de recuento. La muestra se introduce entre la cámara y el cubreobjetos usando una pipeta o tubo capilar y se visualiza la preparación con un objetivo ×40 y un ocular de ×6 o ×10. Con las cámaras de Neubauer y de Neubauer mejorada, se cuentan las células en 4 u 8 rectángulos horizontales de 1 × 0,05 mm (80 o 160 cuadros pequeños) o en 5 o 10 grupos de 16 cuadrados pequeños, incluyendo las células que tocan los márgenes inferiores y derecho de los cuadrados pequeños.

Recuento leucocitario total

Para hacer el recuento leucocitario más fácil, se mezcla la sangre completa diluida con un fluido para lisar los glóbulos rojos y teñir los núcleos de los glóbulos blancos de violeta oscuro-negro.

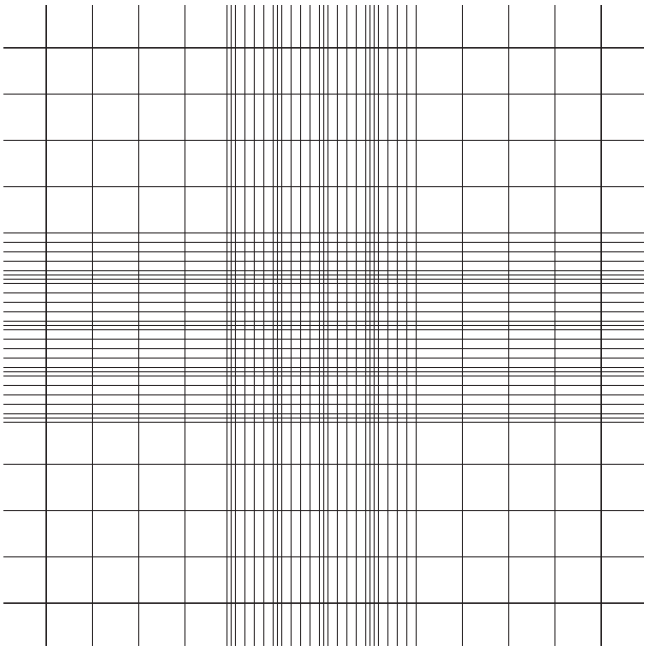


Figura 27.3. Cámaras de recuento de Neubauer. El área total rayada es de 3 mm x 3 mm; el área rayada central es de 1 mm x 1 mm. En el área central, 16 grupos de 16 cuadros pequeños están serparados por una raya triple.

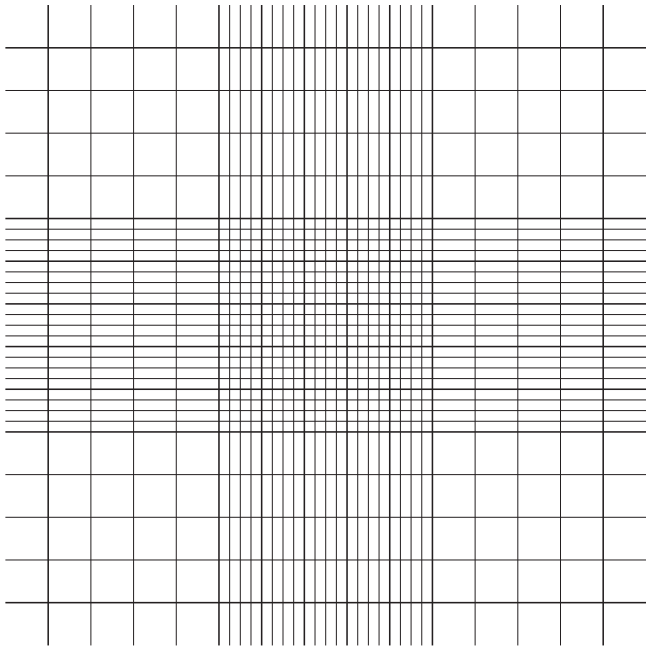


Figura 27.4. Cámaras de recuento de Neubauer mejoradas. El área central consta de 25 grupos de 16 cuadros pequeños separados por líneas triples cercanas (que aparecen como líneas gruesas en la fotografía).

Diluyente

El diluyente es ácido acético al 2% (20 ml/l) coloreado de violeta claro con violeta de genciana.

Método

Hacer una dilución de sangre 1:20 añadiendo 0,1 ml de sangre bien mezclada (la ausencia de mezclado adecuado es una fuente importante de errores) a 1,9 ml de diluyente[f], en un tubo de plástico (o cristal) de 75 × 10 mm. Tras sellar el tubo con una tapa o tapón que ajuste adecuadamente, mezclar la sangre diluida en un mezclador mecánico o manualmente durante al menos 2 min por inclinación del tubo hasta un ángulo de unos 120º combinado con rotación, permitiendo así que las burbujas de aire mezclen la suspensión. Seguidamente, rellenar una cámara de recuento limpia y seca con su cubreobjetos ya colocado. Esto se lleva a cabo simplemente con la ayuda de una pipeta Pasteur o la longitud de un capilar de cristal fuerte que recoge la suspensión por capilaridad. Hay que tener cuidado de que la cámara de recuento se rellene en una vez y que no fluya líquido alrededor del foso.

Dejar la cámara en reposo en una plataforma durante al menos 2 min para que las células se fijen, pero no mucho más, porque el secado de los ángulos de la preparación, que se inicia, causa movimiento de las células después de que éstas se han fijado. La plataforma debe estar libre de vibraciones y la cámara no debe exponerse a corrientes o luz solar directa u otras fuentes de calor. Es importante que el cubreobjetos sea de un cristal grueso especial y perfectamente liso, para que cuando se coloque en la cámara de recuento se vean los anillos de difracción. El cubreobjetos debería ser de un tamaño que permita que, cuando se coloque correctamente en la cámara de recuento, el área central rayada se sitúe en el centro del rectángulo que se rellena con la suspensión celular.

Si se produce cualquiera de los siguientes defectos de llenado, la preparación debe desecharse y el procedimiento de llenado debe repetirse usando otra cámara limpia y seca:

- Desbordamiento al foso.
- Área de la cámara rellena incompletamente.
- Burbujas de aire en cualquier área de la cámara.
- Cualquier residuo en el área de la cámara.

Para obtener un coeficiente de variación del 5%, es necesario contar unas 400 células (tabla 27.1); en la práctica, es razonable contar 100 glóbulos blancos. Para minimizar los errores de distribución, contar las células en el área rayada completa (es decir, áreas de 9 × 0,1 µl en una cámara de recuento de Neubauer mejorada).

Cálculo

Recuento leucocitario por litro (RL/l)

$$= \frac{\text{N.º de células contadas} \times \text{dilución} \times 10^6}{\text{Volumen contado (µl)}}$$

Así, si se cuentan N células en 0,1 µl, entonces el RL/l es como sigue:

[f] O bien a un volumen proporcional más pequeño: 20 ml de sangre en 0,38 ml de fluido de lisado.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 27.1. Varianza del recuento hemático

N.º de áreas	N.º total de células contadas	√	σ	Incertidumbre del total de células contadas	Intervalo por área 1 mm²	Recuento calculado/μl
1	50	7	14	36–64	36–64	7,2–12,8
2	100	10	20	80–120	40–60	8,0–12,0
4	200	14	28	172–228	43–57	8,6–11,4
6	300	17	34	266–334	44–56	8,9–11,1
8	400	20	40	360–440	45–55	9,0–11,0
10	500	22	44	456–544	46–54	9,2–10,8
16	800	28	56	744–856	47–53	9,4–10,6
20	1.000	32	64	936–1.064	47–53	9,4–10,6
30	1.500	39	78	1.422–1.578	47–52	9,4–10,4
200	10.000	100	200	9.800–10.200	49–51	9,8–10,2

El error inherente del resultado de un recuento celular resulta del modo aleatorio en que las células se distribuyen en la cámara de recuento. Esto se conoce como la varianza del recuento (σ); se calcula como √n ÷ n, donde n = número de células contadas realmente y la varianza se expresa como porcentaje. La incertidumbre del recuento está en el intervalo n ± σ.
En este ejemplo teórico, el recuento final (calculado) se basa en el número de células en un área de 1 mm² a una dilución de 1:20. Había aproximadamente 50 células en cada área de 1 mm². Por comodidad, los resultados se han redondeado al número entero más cercano.
Contar sólo uno o dos campos produce una amplia varianza que se reduce cuantas más células se cuentan. Sin embargo, se consigue alta precisión sólo cuando se cuentan miles de células, lo que sólo es posible con contadores celulares automáticos.

$$\frac{N \times 20 \times 10^6}{0,1} = N \times 200 \times 10^6$$

(p. ej., si se cuentan 115 células, el RL es $115 \times 200 \times 10^6/l = 23 \times 10^9/l$).

Intervalos de recuento leucocitario en personas sanas

Véanse las páginas 14 a 16.

Recuento plaquetario

En los laboratorios de escasos recursos, los recuentos manuales se utilizan rutinariamente con muestras de sangre que contienen una proporción significativa de plaquetas gigantes, lo que es necesario incluso en los laboratorios bien equipados. Sin embargo, para el resto de las muestras los aparatos de recuento automáticos de sangre completa consiguen recuentos plaquetarios con una precisión mucho más elevada que con el método manual de recuento de plaquetas. Los recuentos plaquetarios se realizan mejor en sangre anticoagulada con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) obtenida mediante venopunción. También se pueden llevar a cabo con sangre obtenida mediante pinchazo cutáneo, pero los resultados son menos satisfactorios que los de sangre venosa. El recuento plaquetario por punción cutánea es significativamente más bajo que el recuento de sangre venosa y menos constante[17]; probablemente, en el punto de punción de la piel se pierden un número variable de plaquetas. Los recuentos plaquetarios manuales se realizan por examen visual de sangre completa diluida y lisada mediante una cámara de recuento de Neubauer o de Neubauer mejorada igual que para el recuento leucocitario total[18,19].

Método

El diluyente consiste en oxalato de amonio acuoso al 1% en el que se lisan los glóbulos rojos. Se recomienda este método, en comparación con el que usa citrato como diluyente, que deja los glóbulos rojos intactos y es más probable que dé resultados incorrectos cuando el recuento plaquetario es bajo.

Antes de diluir la sangre, examinarla cuidadosamente para detectar la presencia de coágulos de sangre. Si existen, debería solicitarse una muestra reciente, porque los coágulos causarían un recuento plaquetario artificialmente bajo. Hacer una dilución 1:20 de sangre roja bien mezclada en el diluyente añadiendo 0,1 ml de sangre a 1,9 ml de diluyente de oxalato de amonio (10 g/l). No se debería preparar cada vez más de 500 ml de diluyente, y es conveniente usar un recipiente de cristal escrupulosamente limpio y agua fresca destilada o desionizada. Si es posible, la solución debería filtrarse a través de un filtro con microporos (0,22 μm) y mantener a 4 °C. Para usarlo, se vuelve a filtrar una pequeña parte de la solución madre y se dispensa en volúmenes de 1,9 ml en tubos de 75 × 12 mm.

Mezclar la suspensión en un mezclador mecánico durante 10-15 min. Rellenar una cámara de recuento de Neubauer con la suspensión, usando un capilar de cristal fuerte o una pipeta de Pasteur. Colocar la cámara de recuento en una placa de Petri húmeda y dejar en reposo durante al menos 20 min para dar tiempo a que las plaquetas se fijen.

Examinar la preparación con un objetivo ×40 y oculares ×6 o ×10. Las plaquetas, bajo iluminación ordinaria, aparecen como partículas pequeñas (pero no diminutas) altamente refractarias si se visualizan con el condensador cerrado; generalmente están bien separadas y son raros los grupos si la sangre ha sido recogida con habilidad. Para evitar la introducción en la cámara de partículas sucias, que podrían confundirse con las plaquetas, todo el equipo debe estar escrupulosamente limpio. Las plaquetas se ven más fácilmente con el microscopio de contraste de fase. Para un efecto de contraste de fase óptimo es mejor una cámara de recuento especial con el fondo fino (1 μm). Deberían contarse el número de plaquetas en una o más áreas de 1 mm^2. El número total de plaquetas contado debería siempre ser mayor de 200 para asegurar un coeficiente de variación del 8-10%.

Cálculo

$$\text{Recuento de plaquetas por litro} = \frac{\text{N.º de células contadas} \times \text{dilución} \times 10^6}{\text{Volumen contado (μl)}}$$

Así, si N es el número de plaquetas contadas en un área de 1 mm^2 (0,1 μl en volumen), el número de plaquetas por litro de sangre es:

$$N \times 10 \times 20 \text{ (dilución)} \times 10^6 = N \times 200 \times 10^6$$

Intervalo de recuento plaquetario en personas sanas

Véanse páginas 14 a 16.

Errores en el recuento celular manual

Los errores que se asocian con el recuento celular manual son *técnicos* e *inherentes*.

Los errores técnicos pueden minimizarse evitando lo siguiente:

- Técnica inadecuada para la obtención de la muestra de sangre.
- Insuficiente mezclado de la muestra de sangre.
- Pipeteo impreciso y uso de pipetas o cámaras de recuento mal calibradas.
- Inadecuada mezcla de la suspensión celular.
- Relleno defectuoso de la cámara de recuento.
- Recuento poco cuidadoso de las células en la cámara.

Cámaras de recuento estandarizadas

Para reducir los errores es importante tener unas cámaras de recuento de buena calidad. La profundidad exacta de la cámara depende también del cubreobjetos, que debería estar libre de inclinaciones y ser lo suficientemente grueso para no curvarse cuando se presione sobre la cámara. Debe estar sin arañazos e incluso la más pequeña partícula de polvo puede causar desequilibrio en la superficie de la cámara. Las especificaciones descritas por la OMS[16] describen las dimensiones aceptables de las cámaras de recuento que proporcionan una precisión razonable.

Exactitud de las diluciones

No se recomiendan las pipetas de dilución con bulbo, porque son difíciles de calibrar y se rompen fácilmente. Los volúmenes de sangre que emplean son innecesariamente pequeños y es difícil rellenar la cámara de recuento de manera que se libere la cantidad exacta. Las pipetas de 0,1 y 0,02 ml (20 μl) son relativamente baratas y fáciles de calibrar. Con un volumen de 2 ml en un tubo de cristal o plástico provisto de una goma que ajuste adecuadamente o un tapón de plástico, se obtiene una suspensión que es fácil de etiquetar y manejar, y con un poco de práctica se puede conseguir con regularidad un perfecto llenado de la cámara de recuento con la ayuda de una pipeta Pasteur de plástico fino o un tubo capilar de cristal fuerte. Son útiles las unidades de dilución automática. Éstas constan de un sistema de medida dual, que permite que el volumen del diluyente y el volumen de sangre apropiado se dispensen de manera consecutiva en un tubo (v. pág. 600). Actualmente están disponibles una gran variedad de sistemas de dilución automáticos, que tienen gran exactitud y precisión. Las micropipetas manuales semiautomáticas con punta desechable están diseñadas para funcionar como pipetas «para repartir», pero el suministro regular de las puntas desechables, puede ser demasiado caro y difícil de mantener para los laboratorios pobres. Los errores de pipeteo son aplicables a todas las pruebas que implican dilución de las muestras de sangre y también ocurre con dispensadores automáticos, que son propensos a errores con los líquidos viscosos y cuando el volumen liberado de la unidad no está correctamente ajustado.

Artefactos microscópicos

Los detritus de los glóbulos rojos sucios o agregados pueden confundirse con glóbulos blancos o plaquetas. La agregación de los glóbulos blancos se produce particularmente en la sangre heparinizada, especialmente cuando la concentración de heparina excede las 25 UI/ml de sangre. Los agregados se ven con más frecuencia en la sangre que se ha mantenido vertical durante varias horas antes de emprender el recuento.

Los *errores inherentes* resultan de una distribución irregular de las células en la cámara de recuento y ninguna cantidad de la mezcla minimizará esta inherente variación en el número entre las áreas. Los errores inherentes sólo se pueden reducir mediante el recuento de más células en una preparación. En teoría, el recuento varía en proporción a la raíz cuadrada del número de células contadas (es decir, si se cuenta cuatro veces el número de células, la variación se reduce a la mitad [v. tabla 27.1]). Por ejemplo, cuando se realiza un recuento manual leucocitario, el 95% de los recuentos observados en una muestra de valor real $5,0 \times 10^9$ células por litro estarían entre 4,0 y 6,0. En la práctica, la diferencia entre 5,0 y $6,0 \times 10^9$ células por litro en un recuento leucocitario es de poca significación clínica.

Es también importante para el observador no cometer sesgos en el recuento por premoniciones del resultado que puede esperarse o por la selección de ciertas áreas en la cámara de recuento[20].

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

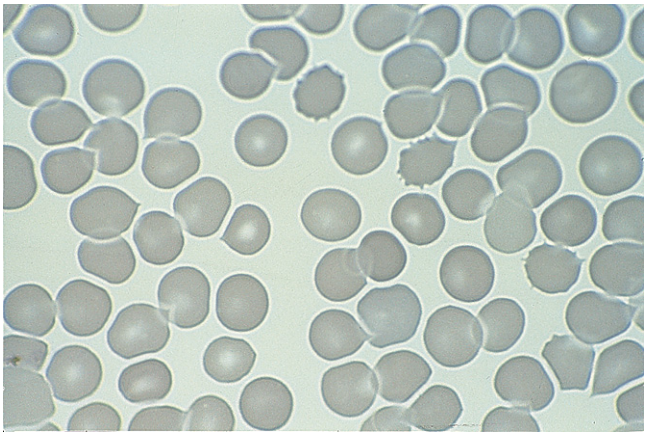


Figura 27.5. Aspectos de los glóbulos rojos en portaobjetos lavados con detergente.

Morfología de la sangre periférica

El examen de un frotis de sangre periférica es de suma importancia. Además de proporcionar información sobre los cambios cuantitativos de los glóbulos rojos, el cuidadoso análisis de los cambios cualitativos puede ayudar a aclarar las razones subyacentes de problemas clínicos. Estas observaciones pueden permitir identificar la causa de la anemia o la fiebre no diagnosticada o la presencia de una hemoglobinopatía (v. cap. 5). Los problemas que pueden producirse durante la preparación de los frotis sanguíneos están relacionados con los portaobjetos en sí mismos y con la calidad de fijación del frotis y los reactivos usados para la tinción. Cuando existe un escaso suministro de portaobjetos, los laboratorios a veces tienen necesidad de lavarlos y reutilizarlos (v. pág. 592). Los restos de detergente, los residuos de colorantes y los arañazos en los portas pueden conducir a una apariencia errónea de los glóbulos rojos (fig. 27.5). En condiciones húmedas, particularmente durante la estación de lluvias, el agua puede ser absorbida por el metanol que se usa para fijar los portaobjetos y esto puede causar artefactos muy marcados en la apariencia de los glóbulos rojos (v. fig. 4.2, pág. 56). Para evitar este problema, las botellas de depósito de metanol deben dejarse muy bien cerradas después de su empleo; para uso diario deberían separarse alícuotas de pequeñas cantidades en botellas con una tapa que encaje perfectamente y reemplazarlas regularmente de la botella de depósito.

Prueba de fragilidad osmótica modificada (prueba de un tubo)

Esta simple y barata prueba para la detección de rasgo talasémico β es útil cuando no es posible la cuantificación de hemoglobina A_2 y no hay disponibles analizadores automáticos estandarizados para una medida precisa del VCM y la HCM[21].

Se han usado varias concentraciones de solución salina tamponada. Se recomienda una concentración de 0,36% en solución salina tamponada (para preparación, v. pág. 588) para asegurar una elevada sensibilidad, con una aceptable especificidad[22,23]. Dado que la tasa de falsos positivos está alrededor del 10%, la confirmación de un resultado positivo requiere el envío de una muestra a un laboratorio capaz de cuantificar hemoglobina A_2. La prueba puede usarse también para detectar rasgo talasémico α^0, remitiendo las muestras positivas a un centro de referencia para análisis del ADN. Alrededor del 50% de las muestras con hemoglobina E también dan un resultado positivo; esto es una ventaja más que un inconveniente porque la detección de hemoglobina E es importante para la predicción de la posibilidad de talasemia mayor o intermedia en heterocigotos compuestos con β-talasemia.

Prueba de detección de la hemoglobina E

Idealmente, el diagnóstico de hemoglobina E en heterocigosis u homocigosis debería hacerse mediante electroforesis de hemoglobina, a pH alcalino o con cromatografía líquida de alta resolución, empleando un segundo método para confirmar la identificación provisional (v. cap. 12). Cuando no se dispone de estos medios, puede emplearse una prueba de detección usando el azul de 2,6-diclorofenolindofenol (DCIP)[g]. Las muestras que contienen hemoglobina E se hacen ligeramente turbias cuando se incuban con DCIP[24,25].

SERVICIOS DE LABORATORIO PARA EL MANEJO DE VIH/SIDA: RECUENTO DE CÉLULAS T CD4+

Las instalaciones para el recuento de CD4+ son esenciales en los países con una elevada incidencia de VIH/sida, tanto para el diagnóstico como para la identificación y el seguimiento de pacientes que se beneficiarían de fármacos antirretrovirales.

Actualmente se dispone de un método que usa una simple plataforma de citometría de flujo individual, que resulta apropiado para los laboratorios de hospitales de distrito[26] (www.guavatechnologies.com). Sin embargo, éste puede ser demasiado complejo de mantener y demasiado caro para instalaciones periféricas en algunos países de escasos recursos. Se ha descrito una técnica de análisis de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) en manchas de sangre secas para cuantificar linfocitos CD4+ fácil de usar sobre el terreno[27]. Sin embargo, no se ha confirmado todavía si este método es efectivo para muestras con recuentos bajos de CD4+. Se están desarrollando otros métodos, incluyendo sistemas de tiras reactivas que todavía requieren estudios de campo.

[g] Para esta prueba existe un equipo adecuado disponible de PCL Holding Co. Ltd., Sirinthorn Road, Bangplad, Bangkok (Fax: 662 881 0989).

GESTIÓN DEL LABORATORIO

Comunicación entre laboratorios

Es necesaria una buena planificación de la logística de un servicio para facilitar el flujo de comunicación entre clínicas y laboratorios centrales y especialistas clínicos. Esto permite el envío sin retrasos, desde el laboratorio central a la periferia, de informes sobre las muestras recibidas de la periferia y consejos relevantes sobre diagnósticos y manejo del paciente. El principal retraso en el tiempo de respuesta tras la llegada (v. pág. 545) es el resultado de una entrega lenta de los informes tras la realización de la prueba. La instalación de faxes y correos electrónicos puede ayudar a eliminar este retraso, pero ambos dependen de una línea de comunicación fija y del suministro eléctrico, los cuales con frecuencia están ausentes en una clínica rural remota.

Una solución potencial es el uso de un sistema de comunicación de datos digital inalámbrica tal como la red de datos para informes de laboratorio Global System of Mobile (GSM)[28]. En algunas poblaciones rurales de países de escasos recursos tienen acceso a comunicaciones inalámbricas que son relativamente bien mantenidas. El volumen de datos requeridos para informes de laboratorio basados en texto es extremadamente modesto y su transmisión es de bajo coste. Los recientes servicios de mensajes mejorados y multimedia también permiten comunicaciones bidireccionales de datos y preguntas sobre bases de datos remotas. Los informes de los resultados pueden incorporarse en el sistema de información del laboratorio principal o de forma individual para laboratorios independientes más pequeños.

Transporte de muestras

En el capítulo 1 se describe la necesidad de asegurar las condiciones apropiadas para la conservación de muestras tras su obtención y otros aspectos del transporte de muestras al laboratorio. Los problemas especiales del transporte de muestras desde clínicas remotas a laboratorios y centros de referencia requieren consideraciones adicionales. Los laboratorios periféricos con recursos relativamente buenos pueden ayudar al desarrollo de iniciativas rurales mediante la creación de oportunidades de empleo para ciclistas, motociclistas, taxistas, compañías de mensajería formales e informales e incluso proveedores de servicios de helicópteros. La localización de las clínicas se facilita si están disponibles las coordenadas del Sistema de Posicionamiento Global (GPS) de cada clínica[29]. Mediante el empleo de los sistemas de comunicación de datos digitales inalámbricos de que se dispone actualmente[h], los servicios de laboratorio de los países de escasos recursos pueden ser modelos para el sistema sanitario en su conjunto.

[h] MTN (www.mtn.co.za); Vodacom (www.vodacom.co.za/default.aspx); Exactmobile (www.exactmobile.com).

Formación del personal

En los países más pobres, a menudo no existen sistemas para una supervisión regular del rendimiento individual en el laboratorio, y mucho personal no recibe formación profesional continuada (v. pág. 536). La evaluación estándar de la práctica debería continuar por el resto de la vida profesional del personal del laboratorio, para asegurar resultados de alta calidad. En países de escasos recursos, la formación puede proporcionarse en asociación con programas de salud vertical, tales como el control del VIH o la tuberculosis, pero a menudo se pasa por alto la necesidad de formación en técnicas hematológicas básicas, porque dichas pruebas, tales como la determinación de la hemoglobina y el recuento leucocitario, no están unidas habitualmente a enfermedades específicas y por ello no son susceptibles de incorporarse a programas verticales. Sin embargo, dado que la anemia es la enfermedad más prevalente en todo el mundo y a menudo es el primer signo de enfermedad subyacente, la importancia de una medida de hemoglobina fiable no puede ser sobreestimada. Así, la formación continuada debería incluir el rango completo de pruebas ofrecidas por el laboratorio y no sólo aquellas que se emplean para ayudar al diagnóstico de enfermedades específicas.

Los individuos necesitan mantener su propio expediente de formación, quizás en forma de cuaderno, y tener sus logros y planes de formación regularmente revisados por sus directores de línea. Deberían mantenerse registros centrales de toda la formación, para propósitos de evaluación y para asegurar una distribución equitativa y apropiada de la formación entre los diferentes niveles del personal. La evaluación regular de la calidad de los resultados de los laboratorios individuales permitirá la identificación de problemas específicos y poner de manifiesto ante los equipos de gestión regional temas tales como fallos de los equipos, discontinuidad de los suministros e interrupciones de las comunicaciones. Además, esta evaluación de la calidad permitirá identificar necesidades de formación diferenciadas, permitiendo limitar los recursos de enseñanza para ser específicamente enfocados.

Actualmente, gracias a un acuerdo entre las principales editoriales internacionales y la OMS, muchas revistas médicas y técnicas publican sus artículos completos en Internet, y se puede acceder a ellos sin cargo o con un descuento significativo en la mayoría de los países de escasos recursos[i].

Interacción del personal clínico

El uso clínico apropiado del laboratorio tiene un impacto directo sobre la relación coste-efectividad del servicio (v. pág. 576). Enfermeras, trabajadores en el campo de la salud y oficiales de salud pública, al igual que doctores pueden ser los responsables de llevar a cabo las pruebas de

[i] www.who.int/hinari/en.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

laboratorio. Muchas de estas personas tienen poca o ninguna formación sobre cómo solicitar la prueba apropiada, cómo proporcionar muestras oportunas y adecuadas y cómo usar los resultados para el máximo beneficio del paciente. La formación de los usuarios del laboratorio necesita incorporarse a los programas de formación del laboratorio y evaluarse con gran atención. En los países más pobres hay a menudo escasez de clínicos con experiencia tanto clínica como de laboratorio que estén cualificados para proporcionar dicha formación. En estas circunstancias pueden mejorarse las relaciones entre el laboratorio y el personal clínico y optimizarse el uso del laboratorio, mediante la utilización de equipos de clínicos y técnicos para que proporcionen formación mixta en ambas disciplinas.

Equipos de gestión de la salud

A menudo, los equipos de gestión de la salud locales son responsables de asegurar que sus laboratorios estén provistos de las herramientas necesarias para proporcionar un servicio de alta calidad. Como regla, estos equipos no incluyen miembros de la profesión de técnicos de laboratorio, los cuales sólo están representados por otros profesionales afines, como farmacéuticos. De esta manera, el personal de los laboratorios de escasos recursos no siempre es responsable de la compra de suministros y equipos para el laboratorio, lo que resulta en pérdidas debidas a la compra de equipos y reactivos inapropiados o de escasa calidad. Además, para promover la adecuada representación de los profesionales de laboratorio en la gestión, es importante asegurar que el personal que no es de laboratorio, responsable de tomar decisiones sobre los laboratorios de escasos recursos, esté informado sobre las necesidades de su servicio de laboratorio.

Salud y seguridad

En el capítulo 25 se describen detalles sobre el tema de la seguridad en el laboratorio. La conciencia sobre estos temas debería promoverse constantemente dentro de todos los laboratorios, y el ambiente de trabajo debe ser tan seguro como sea posible. Debería prepararse un «Código de práctica segura de laboratorio», asequible y relevante a las circunstancias locales. Debería incluir lo siguiente:

- Evaluación del riesgo. Identificación de los peligros potenciales en el lugar de trabajo y el riesgo que suponen para los trabajadores individuales o los visitantes del laboratorio.
- Educación en prácticas de trabajo seguras.
- Seguimiento de la adherencia a las normas de salud y seguridad.
- Informe e investigación rápidos de los accidentes de laboratorio.

Las jeringas desechables (v. pág. 1) están previstas para un solo uso. No pueden esterilizarse y nunca deberían reutilizarse. De manera similar, las lancetas desechables para punciones cutáneas nunca deben reutilizarse. La práctica de usar una única lanceta en varios pacientes consecutivos y limpiarla con alcohol entre cada uso es inaceptable.

BIBLIOGRAFÍA

1. Faiz MA, Yunus EB, Rahman MR, et al 2002 Failure of national guidelines to diagnose uncomplicated malaria in Bangladesh. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 67:396-399.
2. Akpek G, Lee SM, Gagnon DR, et al 2001 Bone marrow aspiration, biopsy, and culture in the evaluation of HIV-infected patients for invasive mycobacteria and histoplasma infections. American Journal of Hematology 67:100-106.
3. Sherman GG, Galpin JS, Patel JM, et al 1999 CD4+ T cell enumeration in HIV infection with limited resources. Journal of Immunological Methods 222:209-217.
4. Glencross D, Scott LE, Jani IV, et al 2002 CD45-assisted PanLeucogating for accurate, cost-effective dual-platform CD4+ T-cell enumeration. Cytometry 50:69-77.
5. Glencross DK, Mendelow BV, Stevens WS 2003 Laboratory monitoring of HIV/AIDS in a resource-poor setting. South African Medical Journal 93:262-263.
6. Eden T 2002 Translation of cure for acute lymphoblastic leukaemia to all children. British Journal of Haematology 118:945-951.
7. Lewis SM, Bain BJ, Swirsky DM 2000 Bench-aid for morphological diagnosis of anaemia. WHO, Geneva.
8. Mundy C, Ngwira M, Kadawele G, et al 2000 Evaluation of microscope condition in Malawi. Transactions of the Royal Society of Medicine and Hygiene 94:583-584.
9. Opoku-Okrah C, Rumble R, Bedu-Addo G, et al 2000 Improving microscope quality is a good investment for under-resourced laboratories. Transactions of the Royal Society of Medicine and Hygiene 94:582.
10. World Health Organization 1998 Laboratory services for primary heath care: requirements for essential clinical laboratory tests. Document: LAB/98.1. WHO, Geneva.
11. Mundy CJF, Bates I et al 2003. The operation, quality and costs of a district hospital laboratory service Malawi. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 97:403-408.
12. Lewis SM, Stott GJ, Wynn KJ 1998 An inexpensive and reliable new haemoglobin colour scale for assessing anaemia. Journal of Clinical Pathology 51:21-24.
13. Timan IS, Tatsumi N, Aulia D, Wangsasaputra E 2004 Comparison of haemoglobinometry by WHO haemoglobin colour scale and copper sulphate against haemiglobincyanide reference method. Clinical and Laboratory Haematology 26:253-258.
14. Van den Broek NR, Ntonya C, Mhanga E, et al 1999 Diagnosing anaemia in pregnancy in rural clinics: assessing the potential of the haemoglobin colour scale. Bulletin of the World Health Organization 77:15-21.
15. Montresor A, Ramsan M, Khalfan N, et al 2003. Performance of the Haemoglobin Colour Scale in diagnosing severe and very severe anaemia. Tropical Medicine International Health 8:1-6.
16. World Health Organization 2000 Recommended methods for the visual determination of white blood cell count and platelet count. Document WHO/DIL/00.3. WHO, Geneva.
17. Brecher G, Schneiderman M, Cronkite EP 1953 The reprodu-

cibility and constancy of the platelet count. American Journal of Clinical Pathology 23:15-26.
18. Brecher G, Cronkite EP 1950 Morphology and enumeration of human blood platelets. Journal of Applied Physiology 3:365-377.
19. Lewis SM, Wardle J, Cousins S, et al 1979 Platelet counting—development of a reference method and a reference preparation. Clinical and Laboratory Haematology 1:227-237.
20. Sanders C, Skerry DW 1961 The distribution of blood cells on haemocytometer counting chambers with special reference to the amended British Standards Specification 748 (1958). Journal of Clinical Pathology 48:298-304.
21. Thomas S, Srivastava A, Jeyaseelan L, et al. 1996 Nestroft as a screening test for the detection of thalassaemia and common haemoglobinopathies—an evaluation against a high performance liquid chromatographic method. Indian Journal of Medical Research. 104:194-197.
22. Kattamis C, Efremov G, Pootrakul S 1981 Effectiveness of one tube osmotic fragility screening in detecting β-thalassaemia trait. Journal of Medical Genetics 18:266-270.
23. Chow J, Phelan L, Bain BJ 2005 The role of a single-tube osmotic fragility for thalassemia screening in under-resourced laboratories. American Journal of Hematology 79:198-201.
24. Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Sae-ung N, et al 2004 A simplified screening strategy for thalassaemia and haemoglobin E in rural communities in south-east Asia. Bulletin of the World Health Organization 82:364-372.
25. Chapple L, Harris A, Phelan L, et al 2005 Reassessment of a simple chemical method using DCIP for screening for haemoglobin E. Journal of Clinical Pathology 59:74-76.
26. Scott LE, Lawrie D, Harvey J, et al 2004 A comparison of the Guava Personal Cell Analyser (PCA) with PLG CD4 T cell enumeration: a pilot evaluation. 11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, San Francisco, Feb. 8-11, 2004.
27. Mwaba P, Cassol S, Pilon R, et al 2003 Use of dried whole blood spots to measure CD4+ lymphocyte counts in HIV-1-infected patients. Lancet 362:1459-1460.
28. Wright B. Rural Doctors Advance Care with Wireless: www.hst.org.za/news/20011026.
29. Medical Research Council of South Africa 2001 Geographic Information Systems in health www.mrc.ac.za/mrcnews/june2001/geoinformation.htm.

Publicaciones de utilidad no referidas explícitamente en el texto

Manejo y organización del laboratorio

World Health Organization 1990 Primary health care—towards the year 2000. WHO/SHS/901. WHO, Geneva.
Houng L, El-Nageh MM 1993 Principles of management of health laboratories. WHO Regional Publications, Eastern Mediterranean Series No. 3.
World Health Organization 1993 Laboratory equipment preventative maintenance programme. In: Principles of management of health laboratories. WHO Regional Publications, Eastern Mediterranean Series No 3.
World Health Organization 1994 Health laboratory facilities in emergency and disaster situations. WHO Regional Publications, Eastern Mediterranean Series No. 6.
World Health Organization 1999 Health laboratory services in support of primary health care in South East Asia. WHO South East Asia Regional Office (SEARO), Publication No. 24 (2nd ed.).

Metodología práctica

World Health Organization 1986 Methods recommended for essential clinical chemical and haematological tests for intermediate hospital laboratories. WHO/LAB/86.3. WHO, Geneva.
Carter JY, Lema OE 1994 Practical laboratory manual for health centres in Eastern Africa. African Medical and Research Foundation, PO Box 31025, Nairobi, Kenya.
World Health Organization 1995 Production of basic diagnostic laboratory reagents. WHO Regional Publications, Eastern Mediterranean Series No. 2.
World Health Organization 2000 Manual of basic techniques (revised 2nd ed.). WHO Distribution and Sales, Geneva.

Garantía de calidad

World Health Organization 1992 Basics of quality assurance for intermediate and peripheral laboratories. WHO Regional Publications, Eastern Mediterranean Series No. 2.
World Health Organization 1993 Quality assurance related to health laboratory technology. WHO, Geneva.
World Health Organization 1995 Quality systems for medical laboratories: Guidelines for implementation and monitoring. WHO Regional Publications, Eastern Mediterranean Series No. 14.
Lewis SM 1998 Quality Assurance in Haematology WHO Document: LAB/98.4. WHO, Geveva.

Mantenimiento de prevención del equipo

World Health Organization 1992 Calibration and maintenance of semi-automated haematology equipment: Document: LBS/92.8. WHO, Geneva.
World Health Organization 1994 Maintenance and repair of laboratory, diagnostic imaging, and hospital equipment. WHO Distribution and Sales, Geneva.

Prácticas para laboratorios

Abbott FR 1992 Teaching for better learning: a guide for teachers of primary health care staff. WHO, Geneva.
World Health Organization 1992 Technical training requirements: report of meeting on development of appropriate technology to support primary health care. WHO, Geneva.
The WHO documents on this list are generally available, without charge, from the Department of Essential Health Technologies, WHO, 1211 Geneva 27 (Fax: +41 22 791 4836) or from the Internet sites (see Table 24.6, p. 635). Documents are also available from the regional offices:
Eastern Mediterranean: PO Box 1517, Alexandria 21511, Egypt.
Southeast Asia: World Health House, Indraprastha Estate, New Delhi, 110002, India.
Other publications from WHO Distribution and Sales are available at reduced prices in developing countries.

Recursos de material educativo y mantenimiento para laboratorios con escasos recursos

Echo Joint Mission Hospital Equipment Board
Ullswater Crescent, Coulsdon, Surrey, CR3 2HR, UK
Tel: +44 (0) 208 660 2220; Fax: +44 (0) 208 668 0751; e-mail: cs@echohealth.org.uk
Developing Health Technology
Bridge House, Worlington Road, Barton Mills, IP28 7DX, UK
Tel: +44 (0) 1603 416058; Fax: +44 (0) 1603 416066; e-mail: dht@gordon-keeble.co.uk
www.dht-online.co.uk

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tropical Health Technology
PO Box 50, Fakenham, Norfolk, NR21 8XB
Tel: +44 (0) 1328 855805; Fax: +44 (0) 1328 853799;
e-mail: thtbooks@tht.ndirect.co.uk

Teaching Aids At Low Cost (TALC)
PO Box 49, St Albans, Herts. AL1 5TX, UK
Tel: +44 (0) 1727 853869; Fax: +44 (0) 1727 846852;
e-mail: Info@talcuk.org
www.talcuk.org
TALC Library/Resource Centre

Institute of Child Health, 30 Guilford Street, London, WC1N 1EH, UK
Tel: +44 (0) 207 242 9789, ext. 2424

28 Apéndices

S. Mitchell Lewis

Preparación de reactivos de uso común, anticoagulantes y soluciones conservantes 587
Tampones 588
Reactivos 590
Valores y reactivos de referencia 591
Preparación del material de cristal 592
Limpieza de portaobjetos 592
Limpieza de recipientes de cristal 592
Tamaños de los tubos 592
Velocidad de centrifugación 592
Unidades de peso y medida de uso común en hematología 592
Pesos atómicos y concentraciones moleculares 593
Dosis de radiación 593
Procedimientos estadísticos 594
Cálculos 594
Análisis de diferencias mediante la prueba-t 595
Análisis de la variación mediante el valor F 595
ANOVA 595
Pipetas automatizadas (mecánicas) 595
Autodiluyentes 600
Microscopio 600
Mantenimiento rutinario del microscopio 601
Sangre desfibrinada 602

PREPARACIÓN DE REACTIVOS DE USO COMÚN, ANTICOAGULANTES Y SOLUCIONES CONSERVANTES

Agua

Para la mayoría de las determinaciones, el agua destilada ya preparada o el agua desionizada resultan igualmente adecuadas. A lo largo del texto este concepto está implícito cuando nos referimos a «agua». Cuando se requiere agua bidestilada o agua destilada purificada, se indica especialmente, y también cuando resulta adecuada o está indicada el agua del grifo.

Solución de ácido-citrato-dextrosa (ACD)—NIH-A

Citrato trisódico, dihidrato (75 mmol/l)	22 g
Acido cítrico monohidrato (42 mmol/l)	8 g
Dextrosa (139 mmol/l)	25 g
Agua hasta 1 litro	

Esterilizar la solución en autoclave a 121 °C durante 15 min. Su pH es 5,4. Para su uso, añadir 10 volúmenes de sangre a 1,5 volúmenes de la solución. Para su empleo en estudios de supervivencia de glóbulos rojos, véase la página 315.

Solución de ácido-citrato-dextrosa (solución de Alsever)

Dextrosa (114 mmol/l)	20,5 g
Citrato trisódico, dihidrato (27 mmol/l)	8,0 g
Cloruro sódico (72 mmol/l)	4,2 g
Agua hasta 1 litro	

Ajustar el pH a 6,1 con ácido cítrico (aproximadamente, 0,5 g) y seguidamente esterilizar la solución mediante filtración por microporo (0,22 μm) o en autoclave a 121 °C durante 15 min. Para su uso, añadir 4 volúmenes de sangre a 1 volumen de solución.

Solución de citrato-fosfato-dextrosa (CPD), pH 6,9

Citrato trisódico, dihidrato (102 mmol/l)	30 g
Fosfato dihidrógeno sódico, monohidrato (1,08 mmol/l)	0,15 g
Dextrosa (11 mmol/l)	2 g
Agua hasta 1 litro	

Esterilizar la solución en autoclave a 121 °C durante 15 min. Después de enfriarse hasta 20 °C, debería tener un tinte marrón y su pH debería ser 6,9.

Solución de citrato-fosfato-dextrosa (CPD), pH 5,6-5,8

Citrato trisódico, dihidrato (89 mmol/l)	26,30 g
Acido cítrico, monohidrato (17 mmol/l)	3,27 g
Fosfato sódico de dihidrógeno, monohidrato (16 mmol/l)	2,22 g
Dextrosa (142 mmol/l)	25,50 g
Agua hasta 1 litro	

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Esterilizar la solución en autoclave a 121 °C durante 15 min. Para su uso como conservante anticoagulante, añadir 7 volúmenes de sangre a 1 volumen de solución.

Solución de citrato-fosfato-dextrosa-adenina (CPD-A), pH 5,6-5,8

Citrato trisódico, dihidrato (89 mmol/l)	26,30 g
Acido cítrico, monohidrato (17 mmol/l)	3,27 g
Fosfato sódico de dihidrógeno, monohidrato (16 mmol/l)	2,22 g
Dextrosa (177 mmol/l)	31,8 g
Adenina (2,04 mmol/l)	0,275 g
Agua hasta 1 litro	

Esterilizar la solución en autoclave a 121 °C durante 15 min. Para su uso como conservante anticoagulante, añadir 7 volúmenes de sangre a 1 volumen de solución.

Solución de baja fuerza iónica (LISS)[1]

Cloruro sódico (NaCl) (30,8 mmol/l)	1,8 g
Fosfato de hidrógeno disódico (Na_2HPO_4) (1,5 mmol/l)	0,21 g
Fosfato dihidrógeno sódico (NaH_2PO_4) (1,5 mmol/l)	0,18 g
Glicina (NH_2CH_2COOH) (240 mmol/l)	18,0 g
Agua hasta 1 litro	

Disolver el cloruro sódico y las dos sales de fosfato en unos 400 ml de agua; disolver la glicina por separado en unos 400 ml de agua, ajustar el pH de cada solución hasta 6,7 con NaOH 1 mol/l. Mezclar las dos soluciones y completar hasta un litro. Esterilizar mediante filtros Seitz o autoclave. El pH debería estar entre 6,65 y 6,85, la osmolaridad entre 270 y 285 mmol y la conductividad entre 3,5 y 3,8 mS/cm a 23 °C.

EDTA

Sal dipotásica de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	100 g
Agua hasta 1 litro	

Dejar secar en frascos a 20 °C volúmenes apropiados para conseguir una concentración de 1,5 ± 0,25 mg/ml de sangre.

EDTA neutro, pH 7,0, 110 mmol/l

Sal dipotásica de EDTA	44,5 g
o sal disódica	41,0 g
NaOH 1 mmol/l	75 ml
Agua hasta 1 litro	

EDTA tamponado neutro, pH 7,0

Sal disódica de EDTA (9 mmol/l)	3,35 g
Fosfato hidrógeno disódico (Na_2HPO_4) (26,4 mmol/l)	3,75 g
Cloruro sódico (NaCl) (140 mmol/l)	8,18 g
Agua hasta 1 litro	

Solución salina

Cloruro sódico (NaCl) (154 mmol/l)	9,0 g
Agua hasta 1 l	

Citrato trisódico ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$), 109 mmol/l

Disolver 32 g[a] en 1 litro de agua. Distribuir volúmenes adecuados (p. ej., 10 ml) en frascos pequeños y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Heparina

En el mercado se encuentra heparina en polvo (sal de litio) con una actividad de 160 UI/mg. Disolverla en agua a una concentración de 4 mg/ml. La heparina sódica se comercializa en ampollas de 5 ml con una actividad de 1.000 UI/ml. Añadir volúmenes apropiados de cada solución a una serie de envases y dejar secar a 20 °C para obtener una concentración que no exceda 15-20 UI/ml de sangre.

TAMPONES

Tampón barbital, pH 7,4

Dietilbarbiturato sódico ($C_8H_{11}O_3N_2Na$) (57 mmol/l)	11,74 g
Ácido clorhídrico (HCl) (100 mmol/l)	430 ml

Solución salina tamponada con barbital, pH 7,4

NaCl	5,67 g
Tampón barbital, pH 7,4	1 l

Antes de usar, diluir con un volumen igual de NaCl a 9 g/l.

Solución salina tamponada con barbital, pH 9,5

Dietilbarbiturato sódico ($C_8H_{11}O_3N_2Na$) (98 mmol/l)	20,2 g
Ácido clorhídrico (HCl) (100 mmol/l)	20 ml
NaCl	5,67 g

Antes de usar, diluir el tampón con un volumen igual de NaCl a 9 g/l.

Tampón de albúmina sérica bovina y barbital, pH 9,8

Dietilbarbiturato sódico ($C_8H_{11}O_3N_2Na$) (54 mmol/l)	10,3 g
NaCl (102 mmol/l)	6,0 g
Azida sódica (31 mmol/l)	2,0 g
Albúmina sérica bovina (BSA)	5,0 g
Agua hasta 1 litro	

Disolver los reactivos en unos 900 ml de agua. Ajustar el pH a 9,8 con HCl 5 mol/l. Completar hasta 1 l con agua. Mantener a 4 °C.

Tampón de citrato solución salina

Citrato trisódico ($Na_3C_6HO_7.2H_2O$) (5 mmol/l)	1,5 g

[a] O bien 38 g de $2Na_3C_6H_5O_7.11H_2O$.

NaCl (96 mmol/l)	5,6 g
Tampón barbital, pH 7,4	200 ml
Agua	800 ml

Tampón glicina, pH 3,0

Glicina (NH_2CH_2COOH) (82 mmol/l)	6,15 g
NaCl (82 mmol/l)	4,80 g
Agua	820 ml
HCl 0,1 mol/l	180 ml

Tampón HEPES, pH 6,6

N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2- ácido etanosulfónico (100 mmol/l)	23,83 g

Disolver en unos 100 ml de agua. Añadir un volumen suficiente de NaOH 1 mol/l (*c* 1 ml) para ajustar el pH a 6,6. Si se tiene previsto usar el tampón con la tinción de Romanowsky (v. pág. 54), añadir 25 ml de dimetilsulfóxido (DMSO). Completar hasta un volumen de 1 litro con agua.

Tampón HEPES–solución salina, pH 7,6

HEPES (20 mmol/l)	4,76 g
NaCl	8,0 g

Disolver en unos 100 ml de agua. Añadir el volumen suficiente de NaOH 1 mol/l para ajustar el pH a 7,6.

Completar hasta un volumen de 1 litro con agua.

Solución salina tamponada con imidazol, pH 7,4

Imidazol (50 mmol/l)	3,4 g
NaCl (100 mmol/l)	5,85 g

Disolver en unos 500 ml de agua. Añadir 18,6 ml de HCl 1 mol/l y completar hasta un volumen de 1 litro con agua. Mantener a temperatura ambiente (18-25 °C).

Tampón fosfato, isoosmótico

(A) $NaH_2PO_4.2H_2O$ (150 mmol/l)	23,4 g/l
(B) NaH_2PO_4 (150 mmol/l)	21,3 g/l

pH	*Solución A*	*Solución B*
5,8	87 ml	13 ml
6,0	83 ml	17 ml
6,2	75 ml	25 ml
6,4	66 ml	34 ml
6,6	56 ml	44 ml
6,8	46 ml	54 ml
7,0	32 ml	68 ml
7,2	24 ml	76 ml
7,4	18 ml	82 ml
7,6	13 ml	87 ml
7,7	9,5 ml	90,5 ml

El suero humano normal tiene una osmolalidad de 289 ± 4 mmol. Hendry[2] recomendaba concentraciones ligeramente diferentes de la solución madre, a saber, 25,05 g/l de $NaH_2PO_4.2H_2O$ y 17,92 g/l de Na_2HPO_4 para un tampón isoosmótico.

Solución salina tamponada con fosfato (PBS)

Volúmenes iguales de tampón fosfato isoosmótico y NaCl 9 g/l.

Tampón fosfato de Sörensen

Soluciones de partida:

	66 mmol/l	*100 mmol/l*	*150 mmol/l*
(A) KH_2PO_4	9,1 g/l	13,8 g/l	20,7 g/l
(B) Na_2HPO_4	9,5 g/l	14,4 g/l	21,6 g/l
o $Na_2HPO_4.2H_2O$	11,9 g/l	18,0 g/l	27,1 g/l

Para obtener una solución con el pH requerido, añadir A y B en las proporciones indicadas:

pH	*A*	*B*
5,4	97,0	3,0
5,6	95,0	5,0
5,8	92,2	7,8
6,0	88,0	12,0
6,2	81,0	19,0
6,4	73,0	27,0
6,6	63,0	37,0
6,8	50,8	49,2
7,0	38,9	61,1
7,2	28,0	72,0
7,4	19,2	80,8
7,6	13,0	87,0
7,8	8,5	91,5
8,0	5,5	94,5

Este tampón no es isoosmótico con el plasma normal (v. anteriormente).

Tampón Tris–HCl (200 mmol/l)

Tris(hidroximetil)aminometano (24,23 g/l)	250 ml

Para obtener una solución con el pH requerido, añadir el volumen apropiado de HCl 1 mol/l y completar el volumen hasta 1 l con agua.

pH	*Volumen*
7,2	44,5 ml
7,4	42,0 ml
7,6	39,0 ml
7,8	33,5 ml
8,0	28,0 ml
8,2	23,0 ml
8,4	17,5 ml
8,6	13,0 ml
8,8	9,0 ml
9,0	5,0 ml

Las soluciones madre de 100 mmol/l, 150 mmol/l, 300 mmol/l y 750 mmol/l s pueden prepararse de manera similar con una apropiada cantidad de Tris y volumen de ácido.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tampón Tris–HCl albúmina sérica bovina (BSA), pH 7,6, 20 mmol/l

Tris-(hidroximetil)aminometano (20 mmol/l)	2,42 g
EDTA, sal disódica (10 mmol/l)	3,72 g
NaCl (100 mmol/l)	5,85 g
Azida sódica (3 mmol/l)	0,2 g

Disolver los reactivos en unos 800 ml de agua. Ajustar el pH a 7,6 con 10 mol/l de HCl. Añadir 10 g de BSA y completar hasta 1 l con agua.

Acetona formalina tamponada

Disolver 20 mg de Na_2HPO_2 y 100 mg KH_2PO_4 en 30 ml de agua destilada. Añadir 45 ml de acetona y 25 ml de formalina al 40%. Mezclar bien y conservar a 4 °C. Usar en frío. Preparar un nuevo fijador cada 4 semanas.

REACTIVOS

Tromboplastina de cerebro de conejo

En la actualidad se comercializa tromboplastina de cerebro de conejo desecada y congelada con una caducidad de 2-5 años o mayor. Normalmente está calibrada contra la preparación de tromboplastina de referencia internacional de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y se suministra con un Índice de Sensibilidad Internacional (ISI) y una tabla para convertir los tiempos de protrombina a Índice Internacional Normalizado (INR).

Si no se dispone de un preparado comercial, es posible preparar un sustituto doméstico empleando cerebro de conejo que no requiere desecado y congelado y que es relativamente estable.

Cerebro en polvo desecado con acetona

Quitar la membrana del cerebro de conejo obtenido recientemente, lavar para dejar limpio de sangre y colocar en acetona fría en una cantidad aproximada de tres veces su volumen. Macerar durante 2-3 min y entonces filtrar a través de un apósito absorbente (calidad BP o USP) en un embudo de Büchner. Repetir la extracción siete veces; después de dos extracciones, incrementar el tiempo de exposición a acetona en 20 min para cada extracción consecutiva. El material debería hacerse «arenoso» en la cuarta o quinta extracción. Después de la última extracción, extender el cerebro secado con acetona sobre un trozo de papel y dejar secar al aire durante 30 min. Frotar contra un tamiz con malla de nailon de 1 mm para conseguir un polvo grueso. Dispensar en un lote de frascos con tapón de rosca y secar con pentóxido de fósforo con un desecador de vacío. Tras el secado enroscar las tapas con fuerza y conservar a 4 °C o –20 °C. A –20 °C, el material debería mantenerse estable al menos 5 años. Con 100 g de cerebro completo se consiguen 15 g de polvo seco.

Preparación de suspensiones líquidas

Disolver 0,9 g de NaCl y 0,9 g de fenol en 100 ml de agua. Suspender 3,6 g de cerebro desecado con acetona en 100 ml de la solución de solución salina-fenol a 15-20 °C y dejar reposar a esta temperatura durante 4-5 h, mezclando cada 30 min. Dejar en una nevera a 4 °C durante 24 h, mezclándolo ocasionalmente. A partir de entonces, dejar sin mover a 4 °C durante 3 h y seguidamente decantar cuidadosamente el sobrenadante a través de una muselina fina u otro material similar. El ISI no debería superar 1,4 (v. pág. 400), y el tiempo medio normal de protrombina debería ser 12-13 s. Conservar la suspensión a 4 °C. A esta temperatura permanecerá estable al menos 6 meses; a temperatura ambiente estará estable al menos 7 días. No debe congelarse, porque la congelación produce floculación de la suspensión con deterioro de la actividad de tromboplastina.

Reactivo fosfolipídico TTPA

El cerebro de ratón desecado con acetona es útil para preparar un reactivo TTPA (tiempo de tromboplastina parcial activado). También se puede usar cerebro de bovino.

Preparar el polvo de cerebro desecado con acetona como se describe anteriormente. Suspender 5 g del polvo en 20 ml de cloroformo (calidad analítica) en un vaso de precipitación cubierto, durante 1-2 h. Filtrar a través de papel de filtro para obtener un filtrado claro. Lavar el depósito de cerebro del papel de filtro con 20 ml de cloroformo y mezclar el filtrado obtenido con el filtrado anterior. Evaporar el filtrado para desecarlo en un vaso de precipitación de peso conocido en un baño de agua a 60-70 °C y pesar el sedimento residual: 5 g de cerebro desecado deberían producir 1,5 g de sedimento fosfolipídico. Emulsionar en solución salina para conseguir una emulsión al 5%; de 1,5 g de sedimento deberían obtenerse 30 ml de emulsión. Distribuir la emulsión en pequeños volúmenes en tubos con tapón. A –20 °C debería permanecer estable al menos un año.

Para su uso, diluir 1:100 en solución salina y mezclar con volúmenes iguales de suspensión de caolín en tampón de imidazol.

Suspensión de riñón de cobaya

Retirar la cápsula y la grasa perirrenal de al menos dos pares de riñones. Seguidamente lavarlos bien con agua bajo el grifo. Homogeneizar el tejido en NaCl 9 g/l (solución salina) en una batidora durante 2 min, esterilizar a 121 °C (con autoclave a una presión de 6,8 kg durante 20 min) y batir de nuevo hasta obtener una suspensión fina. A continuación, centrifugar la suspensión en solución salina y lavar el sedimento con dos cambios de solución salina. Finalmente, añadir al sedimento unas cuatro veces su volumen, de 5 g/l de fenol en solución salina. Después de resuspender, centrifugar la muestra en un tubo de hematocrito para calcular su concentración. Entonces añadir suficiente fenol-solución salina al resto para producir una suspensión 1:6. Utilizarlo sin diluir más. Debe analizarse su poder absorbente con sueros positivos o negativos conocidos.

Los reactivos mantienen su potencia durante al menos 1 año si se conservan a 4 °C.

Suspensión de hematíes de buey

Lavar las células de buey, en varios cambios de NaCl, 9 g/l (solución salina) y preparar una suspensión al 30%. Seguidamente esterilizarla a 121 °C (con el autoclave a una presión de 6,8 kg durante 20 min). Cuando se enfríe, ajustar el hematocrito a 0,20 con solución salina y añadir un volumen igual de solución salina-fenol 10 g/l para conseguir una suspensión al 10%.

La capacidad de la suspensión para absorber los anticuerpos de la mononucleosis infecciosa debe analizarse con sueros positivos conocidos. Si se conserva a 4 °C debería mantener su potencia durante varios años.

VALORES Y REACTIVOS DE REFERENCIA

La OMS ha establecido un amplio rango de materiales de referencia internacionales que son controlados por instituciones designadas. La mayoría de los materiales de interés hematológico enumerados abajo son controlados por el National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC). Los que están marcados con un asterisco son controlados por el International Laboratory for Biological Standards de la OMS, Central Laboratory of the Netherlands Red Cross Blood Transfusion Service (CLB). En la página web de la OMS (www.who.int/bloodproducts/catalogue/en/index.html) está disponible un catálogo y también pueden encontrarse detalles en la página web de la NIBSC (www.nibsc.ac.uk/products/catalogue.html).

Hematología general

- Eritropoyetina humana urinaria.
- Eritropoyetina recombinante derivada de ADN.
- Ferritina humana recombinante.
- Cianometahemoglobina.
- HbA_2.
- HbF.
- Folato en sangre total.
- Proteína C reactiva (PCR).
- Proteínas séricas humanas mediante inmunoensayo: incluyendo transferrina*.

Inmunohematología

- Antisuero anti-A para tipificación de grupo sanguíneo*.
- Antisuero anti-B para tipificación de grupo sanguíneo*.
- Antisuero anti-D (anti-Rh^0) incompleto para tipificación de grupo sanguíneo*.
- Antisuero anti-D (anti-Rh^0) completo para tipificación de grupo sanguíneo*.
- Antisuero anti-E completo para tipificación de grupo sanguíneo*.

Inmunología

- Inmunoglobulinas séricas humanas, inmunoglobulina G (IgG), IgA e IgM.
- Inmunoglobulina IgE sérica humana.
- Factor antinuclear, homogéneo*.
- Peroxidasa de rábano conjugada con IgG de oveja anti-IgG humana*.
- Componentes del complemento séricos humanos C1q, C4, C5, factor B y la actividad funcional CH_{50}*.

Coagulación

- Ancrod.
- Antitrombina plasmática.
- Concentrado de antitrombina.
- Factores II, VII, IX, X (combinados como concentrados).
- Factor VIII y factor de Von Willebrand plasmáticos.
- Concentrado factor VIII.
- Concentrado factor IXa.
- Heparina de bajo peso molecular.
- Fibrinógeno plasmático.
- Plasmina.
- Activador-inhibidor del plasminógeno.
- Activador tisular del plasminógeno recombinante.
- Estreptocinasa.
- α-trombina.
- β-tromboglobulina.
- Antígeno plaquetario antihumano-1a.
- Factor plaquetario 4.
- Proteína S plasmática.
- Proteína C plasmática.
- Protamina.
- Urocinasa de alto peso molecular.
- Tromboplastina bovina combinada*.
- Tromboplastina humana recombinante*.
- Tromboplastina de conejo pura*.
- Concentrado de factor de Von Willebrand.
- Factor de Von Willebrand: Ag (antígeno); RCO (actividad del cofactor de la ristocetina); CB (actividad fijadora del colágeno).

La Unión Europea ha establecido los siguientes materiales certificados de referencia (BCR):

- Cianometahemoglobina.
- Tamaño de las partículas de látex: CRM165: 2,2 mm (5,7 fl); CRM166: 4,8 mm (60,0 fl); CRM167: 9,5 mm de diámetro.
- Tromboplastina bovina (CRM148).
- Tromboplastina de conejo pura (CRM149).
- Proteínas séricas humanas (CRM470), incluyendo haptoglobina.

Direcciones de contacto

National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC)
Blanche Lane, South Mimms, Herts EN6 3QH, Inglaterra.
Tel: 44 1707 646399
Fax: 44 1707 646977
Correo electrónico: standards@nibsc.ac.uk

Central Laboratory of Netherlands Red Cross Blood Transfusion Service (CLB)
125 Plesmanlaan, 1066 AD Amsterdam, Países Bajos

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tel: 31 20 512 9222
Fax: 31 20 512 3252

European Union (BCR)
Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM)
Retieseweg B2440, Geel, Bélgica
Fax: 32 14 590 406
Correo electrónico: bcr.sales@irmm.jrc.be

PREPARACIÓN DEL MATERIAL DE CRISTAL

Recipientes de cristal siliconados

Utilizar una solución de silicona al 2% (dimetildiclorosilano) en solvente. Sumergir el recipiente de cristal limpio o las jeringas que se quieran recubrir en el líquido y dejar escurrir hasta que se sequen. (Deberían usarse guantes de goma y el procedimiento debería hacerse en una campana de humos con extractor.) Seguidamente, aclarar minuciosamente con agua el recipiente de cristal recubierto y dejar secar en un horno a 100 °C durante 10 min o durante la noche en un incubador.

Limpieza de portaobjetos

Portaobjetos nuevos

Se comercializan varias marcas de portaobjetos libres de grasa. Si no se dispusiera de ellas, debe realizarse el siguiente procedimiento. Dejar los portaobjetos durante la noche en una solución de detergente. Seguidamente, lavar bien bajo agua del grifo, aclarar con agua destilada o desionizada y conservar en etanol o metanol al 95% hasta su uso. Secar con un paño de lino limpio y quitar el polvo cuidadosamente antes de su uso.

Portaobjetos sucios

Cuando se desechen, colocarlos en una solución de detergente; calentar a 60 °C durante 20 min; y lavar bajo el grifo con agua caliente. Finalmente, aclarar con agua antes de secar con un paño de lino limpio.

Limpieza de recipientes de cristal

Lavar con agua del grifo. Seguidamente hervir en una solución de detergente; aclarar en ácido, y lavar bajo el grifo con agua caliente, como se describe arriba. Alternativamente, el equipo puede sumergirse en HCl 3 mol/l.

Para eliminar los restos de proteínas y otras materias orgánicas, se recomiendan detergentes «biodegradables». Es adecuado el Decon 90 (Decon Laboratories Ltd, Hove BN3 3LY, Reino Unido), pero también se dispone de varios preparados similares.

Recipientes de cristal libres de hierro

Lavar en una solución de detergente; seguidamente, sumergir en HCl 3 mol/l durante 24 h; finalmente, aclarar en agua desionizada bidestilada.

TAMAÑOS DE LOS TUBOS

Los tamaños de los tubos recomendados en el texto se han escogido por ser los apropiados para las pruebas descritas. Las dimensiones que se dan son la longitud y el diámetro externo (en mm). Algunos catálogos proporcionan el equivalente en pulgadas, y algunos de los diámetros internos correspondientes son los siguientes:

75 × 10 mm.
(diámetro interno 8 mm) = 3 × $^{3}/_{8}$ pulgadas.
75 × 12 mm.
(diámetro interno 10 mm) = 3 × $^{1}/_{2}$ pulgadas.
65 × 10 mm = $2^{1}/_{2}$ × $^{3}/_{8}$ pulgadas.
38 × 6,4 mm = $1^{1}/_{2}$ × $^{1}/_{4}$ pulgadas («tubos de precipitina»).
100 × 12 mm = 4 × $^{1}/_{2}$ pulgadas.
150 × 16 mm = 6 × $^{5}/_{8}$ pulgadas.
150 × 19 mm = 6 × $^{3}/_{4}$ pulgadas.

VELOCIDAD DE CENTRIFUGACIÓN

En todo el libro, la unidad empleada es la fuerza centrífuga relativa (g). La conversión de esta cifra a rpm (revoluciones/min) depende del radio de la centrífuga; puede calcularse empleando el nomograma ilustrado en la figura 28.1 o con la fórmula para la fuerza centrifuga relativa (FCR):

$$FCR = 118 \times 10^{-7} \times r \times N^{-2}$$

donde r = radio (cm) y N = velocidad de rotación (rpm).

Se recomiendan las siguientes fuerzas centrífugas:

«Bajo centrifugado» plasma rico en plaquetas	150-200 g (durante 10-15 min)
«Alto centrifugado» plasma	1.200-1.500 g (durante 15 min)
Hematocrito	2.000-2.300 g (durante 30 min)

UNIDADES DE PESO Y MEDIDA DE USO COMÚN EN HEMATOLOGÍA

A lo largo del libro las medidas se han expresado en unidades del SI, de acuerdo con las recomendaciones universales[3]. Estas unidades derivan del sistema métrico. A continuación se muestran las unidades básicas y las formas abreviadas se indican a su lado.

Peso-unidad: gramo (g)

× 10^{3} = kilogramo (kg)
× 10^{-3} = miligramo (mg)
×10^{-6} = microgramo (µg)
× 10^{-9} = nanogramo (ng)
× 10^{-12} = picogramo (pg)
× 10^{-15} = fentogramo (fg)

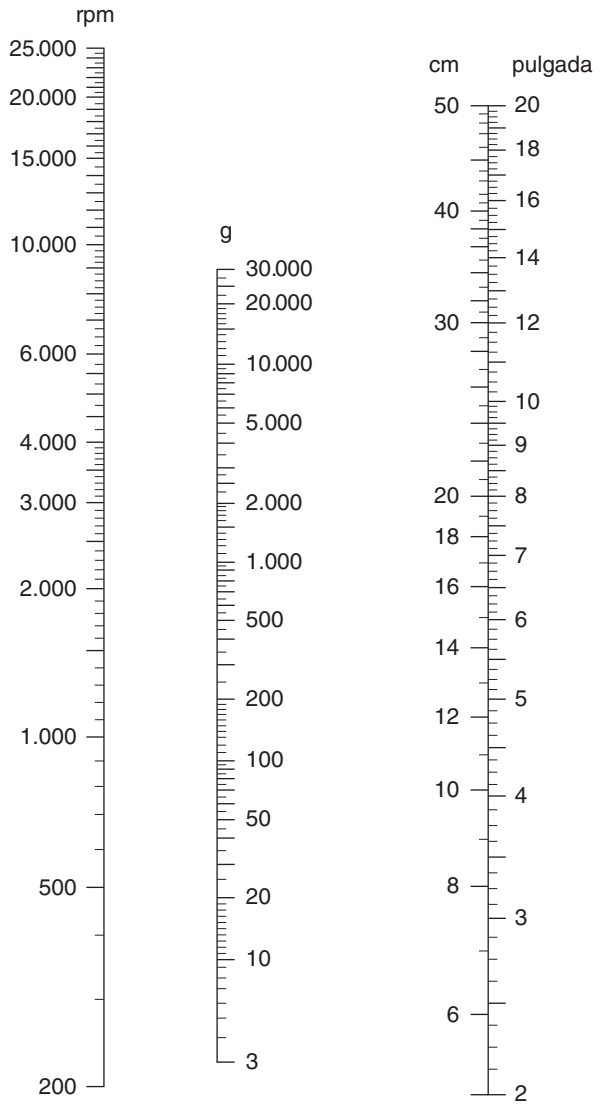


Figura 28.1. Nomograma para calcular las fuerzas centrífugas relativas.

Longitud – unidad: metro (m)

$\times 10^{-1}$ = decímetro (dm)
$\times 10^{-2}$ = centímetro (cm)
$\times 10^{-3}$ = milímetro (mm)
$\times 10^{-6}$ = micrómetro (µm)
$\times 10^{-9}$ = nanómetro (nm)

Volumen – unidad: litro (l o L) = dm^3

$\times 10^{-1}$ = decilitro (dl) (previamente 100 ml)
$\times 10^{-3}$ = mililitro (ml) = cm^3 (previamente cc)
$\times 10^{-6}$ microlitro (µl) = mm^3
$\times 10^{-9}$ = nanolitro (nl)
$\times 10^{-12}$ = picolitro (pl)
$\times 10^{-15}$ fentolitro (fl)

Cantidad de sustancia – unidad: mol (mol)

$\times 10^{-3}$ = milimol (mmol)
$\times 10^{-6}$ = micromol (µmol)

Concentración de una sustancia – unidad: moles por litro (mol/l) (previamente M)

$\times 10^{-3}$ = milimoles por litro (mmol/l)
$\times 10^{-6}$ = micromoles por litro (µmol/l)

Concentración de masa–unidad: gramos por litro (g/l)

$\times 10^{-3}$ = miligramos por litro (mg/l)
$\times 10^{-6}$ = microgramos por litro (µg/l)

Cuando se prepara una cantidad pequeña de un reactivo, es más apropiado expresar su concentración por ml o dl.

Para convertir una medida de concentración de masa a concentración molar, se divide por la masa molecular. Así, por ejemplo, la masa molecular de la Hb humana (como tetrámero 4Fe) es 64.458 (v. pág. 25) o 16.114 como monómero Fe. Por ello cuando la Hb es 160 g/l, esto equivale a 160 ÷ 16,114 mol/l (es decir, 9,9 mmol/l).

PESOS ATÓMICOS Y CONCENTRACIONES MOLECULARES

La concentración de una sustancia en solución puede expresarse tanto en g/l como en mol/l. La última se indica también mediante M (p. ej., HCl 0,1 M = 0,1 mol/l). Un mol (mol) es el peso molecular o la masa molecular relativa (MMR) de la sustancia (incluyendo el agua de cristalización si está presente). Así, por ejemplo:

MMR de NaCl = 58,5; entonces 1 mol/l
= 58,5 g/l y 9 g/l= 9 ÷ 58,5= 0,154 mol/l
= 154 mmol/l

Los pesos atómicos de algunos compuestos químicos de uso común en la preparación de reactivos son los siguientes:

Calcio	40
Carbono	12
Cloro	35
Cromo	52
Hidrógeno	1
Hierro	56
Magnesio	24
Nitrógeno	14
Oxígeno	16
Fósforo	31
Potasio	39
Sodio	23
Azufre	32

DOSIS DE RADIACIÓN

Cuando se emplean radioisótopos, debe tenerse en cuenta su riesgo potencial para el receptor y los trabajadores del laboratorio. El grado de riesgo de la radiación, en relación con las pequeñas cantidades de radioisótopos empleados en las pruebas diagnósticas, depende de un número de factores, a saber: la energía y el rango de las radiaciones; si

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

el radioisótopo está ampliamente distribuido en el cuerpo o si se localiza en órganos específicos, la semivida física de los radioisótopos, y su semivida biológica en el cuerpo.

Antiguamente, la radioactividad se expresaba en curies (Ci); 10^{-3} Ci = 1 mCi y 10^{-6} = 1 μCi. La unidad de radiactividad del SI preferida es el Becquerel (Bq). 1 Bq corresponde a una desintegración por segundo, así que 1 Ci = 3,7 × 10^{10} Bq, 1 milicurie (mCi) = 3,7 × 10^{7} Bq o 37 megabecquerels (MBq) y 1 microcurie (μCi) = 3,7 × 10^{4} Bq o 0,037 MBq; 10^{3} MBq = 1 gigabecquerel (GBq).

El efecto de la radiación sobre el cuerpo depende, esencialmente, de la cantidad de energía depositada. Esto se expresa en grays (Gy); 1 Gy es la dosis de radiación que deposita un julio de energía por kg de tejido. En el pasado, esto se expresaba en rads (1 Gy = 100 rad). La reacción del cuerpo a la radiación también depende del tipo de la radiación iónica particular. Los efectos biológicos de la radiación se calculan a partir de la cantidad de Gy (o rad) multiplicada por un factor de calidad ionizante; este factor varía con el tipo de radiación y es veinte veces mayor para rayos-α que para rayos-β o rayos-γ. La unidad para describir el efecto biológico de la radiación (es decir, la unidad de «dosis efectiva») es el Sievert (Sv). La dosis anual límite para el cuerpo completo para alguien que trabaja con radioisótopos es 50 mSv, con una cantidad mayor para órganos individuales. A las personas que no forman parte del personal sanitario se les aplican límites de dosis más bajas, de 5mSv.

PROCEDIMIENTOS ESTADÍSTICOS

La **media** ($\bar{x}$) es la suma de todas la medidas (Σ) dividido por el número de medidas (n).

La **mediana** (m) es el punto de la escala que tiene un número igual de observaciones por encima y por debajo.

La **moda** es el resultado más frecuente.

La **distribución de Gauss** describe eventos o datos que ocurren simétricamente alrededor de la media (v. fig. 2.1, págs. 11-12); con este tipo de distribución, la media, la mediana y la moda son aproximadamente iguales. El grado de variación de las medidas alrededor de la media se expresa como la desviación estándar (DE). Su cálculo se describe más adelante. Esto quiere decir que el 68% de las medidas estarán en un rango de ±1 DE, el 95% estarán en ± 2 DE y el 99% estarán en ±3 DE.

Los **intervalos de confianza** indican los límites superiores e inferiores entre los que se espera que se encuentre una proporción especificada de los resultados (p. ej., el 95%).

La **distribución normal logarítmica** describe sucesos que son asimétricos (oblicuos), con un gran número de observaciones hacia el final. Por ello, la media estará más cerca del final; la media, la mediana y la moda pueden diferir la una de la otra. Para calcular la media geométrica y la DE de los logaritmos, los datos son primero transformados a sus logaritmos y después de calcular la media y la DE de los logaritmos, los resultados son reconvertidos a antilogaritmos.

La **distribución de Poisson** describe eventos que ocurren aleatoriamente. Esto por ejemplo, puede ser el caso de cuando se hace un recuento de glóbulos rojos en una suspensión diluida. El número de células contadas en un volumen dado variará en cada ocasión; esta variación en el recuento (σ) es 0,92 $\sqrt{\lambda}$, donde λ = número total de células contadas (v. pág. 581). Esto es una estimación de la desviación estándar en la población completa, mientras que DE indica la desviación estándar de las variables que se han medido realmente.

El **coeficiente de variación (CV)** es otro modo de indicar la desviación estándar, relativo a las medidas reales, de manera que puedan compararse las variaciones a diferentes niveles. Se expresa como un porcentaje.

El **error estándar de la media (EEM)** es una medida de dispersión de la media de un conjunto de medidas. Se usa para comparar medias de dos conjuntos de datos.

Cálculos

Varianza (s^2)

$$\frac{\Sigma(x - \bar{x})^2}{n-1}$$

Desviación estándar (DE)

$$\sqrt{s^2}$$

Coeficiente de variación (CV) como porcentaje

$$\frac{DE \times 100\%}{\bar{x}}$$

Error estándar de la media (EEM)

$$\frac{DE}{\sqrt{n}}$$

Desviación estándar de resultados pareados

$$\sqrt{\frac{\Sigma d^2}{2n}}$$

donde d = diferencias entre medidas pareadas y n = número de medidas pareadas.

Desviación estándar de la media

$$\frac{\text{Central } 50\%}{1,35} \text{ (entre 25 y 75\%)}$$

Intervalo de confianza

Decidir el intervalo de confianza requerido (p. ej., 95 o 99%).

En la tabla de la prueba-t (v. pág. 596) encontrar el número con n–1 grados de libertad.

Calcular la DE y el EEM como se describe arriba.

De esta manera el intervalo de confianza estará entre $\bar{x}$ – (t × EEM) y $\bar{x}$ + (t × EEM).

Cuando los datos originales no siguen la distribución de Gauss, convertirlos a sus logaritmos, usar estas cifras para todos los cálculos y convertir los resultados a sus antilogaritmos.

Análisis de diferencias mediante la prueba-t

El análisis de las diferencias mediante la prueba-t es un método para comparar dos series de datos (p. ej., para evaluar la precisión de un nuevo método contra un método de referencia).

Cálculo

Determinar la diferencia en cada par de pruebas (d) y la media de las diferencias ($\bar{d}$).

La varianza se obtiene de $\frac{(d - \bar{d})^2}{n-1}$; $t = \bar{d} \div \frac{s^2}{n}$

Obtener el valor de la t, para los grados de libertad apropiados (es decir, n – 1), de la gráfica de la prueba-t (tabla 28.1). Expresar los resultados con el nivel de probabilidad (p) para el que no hay diferencias significativas entre las series de datos que se están comparando.

Análisis de la variación mediante el valor F

El análisis de la variación por el valor F es un método que se utiliza para evaluar la precisión relativa de dos series de medidas.

Cálculo

Determinar la varianza (s^2) como se describe previamente para cada serie. Dado que el valor no debe ser menor de 1, emplear la varianza más alta en el numerador. Entonces, leer el valor en la gráfica para las dos series de datos (tabla 28.2), con una probabilidad del 95 o 99% (es decir, p = 0,05 o p = 0,01) para los grados de libertad apropiados (es decir, n – 1).

Interpretación

Hay una diferencia significativa en la variación entre las dos series cuando el valor calculado es mayor que el valor leído en la gráfica.

ANOVA

ANOVA es otro método que suma los análisis de la variación al cuadrado cuando compara dos series de datos (p. ej., dos métodos diferentes para hacer una prueba o los resultados de dos individuos A y B haciendo la misma prueba).

	Serie A	*Serie B*
Número de medidas	n	n
Añadir todos los resultados de cada uno de las dos series	Σ A	Σ B
Elevar al cuadrado cada suma	$(\Sigma A)^2$	$(\Sigma B)^2$

Combinar las series y dividir por el número de mediciones:

$$\frac{(\Sigma A)^2 + (\Sigma B)^2}{n}$$

Restar el factor de corrección:

$(\Sigma A + \Sigma B)^2 \div (n \text{ total de } A + B)$

Comparar esta medida con los valores que aparecen en la tabla de distribución de la F al 95 o 99% para los grados de libertad apropiados. Si la suma calculada es mayor que la obtenida en la tabla, se puede concluir que hay una probabilidad del 95 (o 99%) de que las diferencias entre las series sean significativas y no sólo resultado del azar.

PIPETAS AUTOMATIZADAS (MECÁNICAS)

La precisión del pipeteo es un requisito esencial para todas las pruebas cuantitativas. Existen una variedad de pipetas manuales automáticas, muchas de las cuales incorporan una punta desechable con un mecanismo eyector, que permite a la persona que lo usa quitarlo sin contacto manual. Algunas pipetas tienen una capacidad fija; en otras se puede obtener un rango de volúmenes por medio de una rueda de ajuste, y el volumen liberado se puede ver en una pantalla digital. Debido a que los diseños son variados, deben seguirse cuidadosamente las instrucciones específicas del fabricante. Los siguientes puntos son comunes:

1. Usar siempre la punta especificada.
2. Nunca lavar ni reutilizar las puntas.
3. Asegurarse de que la punta esté firmemente ajustada a la pipeta.
4. Mantener la pipeta limpia de suciedad y grasa.
5. Mantener la pipeta siempre en posición vertical.
6. No dejar la pipeta de lado con líquido en la punta.
7. Dejar la pipeta en su base después de usarla.
8. Trabajar con un procedimiento lento, tranquilo y coherente, evitando las burbujas o la espuma.
9. Emplear el «pipeteo inverso» para el plasma, los fluidos de elevada viscosidad y/o volúmenes muy pequeños. Con el émbolo presionado hasta el fondo (2.º tope), introducir la punta profundamente bajo la superficie del fluido y liberar el botón del émbolo lentamente. Retirar la pipeta, limpiar cuidadosamente la punta con un papel; y entonces, con la punta contra la pared interior del recipiente receptor, liberar el contenido soltando el botón del émbolo hasta el 1.er tope. A continuación, desechar la punta con su contenido residual.
10. Para dilución de la sangre, rellenar y vaciar la punta con sangre 2-3 veces; entonces presionar el émbolo al 1.er tope. Con la punta profundamente bajo la superficie de la muestra, liberar el émbolo para rellenar la punta con sangre. Retirar la pipeta de la muestra, limpiar el exterior de la punta cuidadosamente con un papel, introducir la punta en el diluyente profundamente bajo la superficie y presionar el botón del émbolo repetidamente para rellenar y vaciar la punta hasta que la pared interior esté limpia. Entonces presionar el émbolo hasta el 2.º tope para vaciar la punta completamente.
11. A intervalos, evaluar la fiabilidad de la pipeta evaluando su exactitud y precisión.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Table 28.1. Valores críticos de la prueba-t

	% de nivel de probabilidad						
gl	50 (0,5)	40 (0,4)	30 (0,3)	20 (0,2)	10 (0,1)	5 (0,05)	1 (0,01)
1	1,000	1,376	1,963	3,078	6,314	12,706	63,657
2	0,816	1,061	1,386	1,886	2,920	4,303	9,925
3	0,765	0,978	1,250	1,638	2,353	3,182	5,841
4	0,741	0,941	1,190	1,533	2,132	2,776	4,604
5	0,727	0,920	1,156	1,476	2,015	2,571	4,032
6	0,718	0,906	1,134	1,440	1,943	2,447	3,707
7	0,711	0,896	1,119	1,415	1,895	2,365	3,499
8	0,706	0,889	1,108	1,397	1,860	2,306	3,355
9	0,703	0,883	1,100	1,383	1,833	2,262	3,250
10	0,700	0,879	1,093	1,372	1,812	2,228	3,169
11	0,697	0,876	1,088	1,363	1,796	2,201	3,106
12	0,695	0,873	1,083	1,356	1,782	2,179	3,055
13	0,694	0,870	1,079	1,350	1,771	2,160	3,012
14	0,692	0,868	1,076	1,345	1,761	2,145	2,977
15	0,691	0,866	1,074	1,341	1,753	2,131	2,947
16	0,690	0,865	1,071	1,337	1,746	2,120	2,921
17	0,689	0,863	1,069	1,333	1,740	2,110	2,989
18	0,688	0,862	1,067	1,330	1,734	2,101	2,878
19	0,688	0,861	1,066	1,328	1,729	2,093	2,861
20	0,687	0,860	1,064	1,325	1,725	2,086	2,845
21	0,686	0,859	1,063	1,323	1,721	2,080	2,831
22	0,686	0,858	1,061	1,321	1,717	2,074	2,819
23	0,685	0,858	1,061	1,321	1,717	2,074	2,819
24	0,685	0,857	1,059	1,318	1,711	2,064	2,797
25	0,684	0,856	1,058	1,316	1,708	2,060	2,787
26	0,684	0,856	1,058	1,315	1,706	2,056	2,779
27	0,684	0,855	1,057	1,314	1,703	2,052	2,771
28	0,683	0,855	1,056	1,313	1,701	2,048	2,763
29	0,683	0,854	1,055	1,311	1,699	2,045	2,756
30	0,683	0,854	1,055	1,310	1,697	2,042	2,750
40	0,681	0,851	1,050	1,303	1,684	2,021	2,704
50	0,680	0,849	1,048	1,299	1,676	2,008	2,678
60	0,679	0,848	1,046	1,296	1,671	2,000	2,660
120	0,677	0,845	1,041	1,289	1,658	1,980	2,617
∞	0,674	0,842	1,036	1,282	1,645	1,960	2,576

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Tabla 28.2. Tablas de distribución de la F (a) probabilidad 99% (p = 0,01)

	gl Numerador																		
gl Numerador	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	∞
1	4052	4999,5	5403	5625	5764	5859	5928	5981	6022	6056	6106	6157	6209	6235	6261	6287	6313	6339	6366
2	98,50	99,00	99,17	99,25	99,30	99,33	99,36	99,37	99,39	99,40	99,42	99,43	99,45	99,46	99,47	99,47	99,48	99,49	99,50
3	34,12	30,82	29,46	28,71	28,24	27,91	27,67	27,49	27,35	27,23	27,05	26,87	26,69	26,60	26,50	26,41	26,32	26,22	26,13
4	21,20	18,00	16,69	15,98	15,52	15,21	14,98	14,80	14,66	14,55	14,37	14,20	14,02	13,93	13,84	13,75	13,65	13,56	13,46
5	16,26	13,27	12,06	11,39	10,97	10,67	10,46	10,29	10,16	10,05	9,89	9,72	9,55	9,47	9,38	9,29	9,20	9,11	9,02
6	13,75	10,92	9,78	9,15	8,75	8,47	8,26	8,10	7,98	7,87	7,72	7,56	7,40	7,31	7,23	7,14	7,06	6,97	6,88
7	12,25	9,55	8,45	7,85	7,46	7,19	6,99	6,84	6,72	6,62	6,47	6,31	6,16	6,07	5,99	5,91	5,82	5,74	5,65
8	11,26	8,65	7,59	7,01	6,63	6,37	6,18	6,03	5,91	5,81	5,67	5,52	5,36	5,28	5,20	5,12	5,03	4,95	4,86
9	10,56	8,02	6,99	6,42	6,06	5,80	5,61	5,47	5,35	5,26	5,11	4,96	4,81	4,73	4,65	4,57	4,48	4,40	4,31
10	10,04	7,56	6,55	5,99	5,64	5,39	5,20	5,06	4,94	4,85	4,71	4,56	4,41	4,33	4,25	4,17	4,08	4,00	3,91
11	9,65	7,21	6,22	5,67	5,32	5,07	4,89	4,74	4,63	4,54	4,40	4,25	4,10	4,02	3,94	3,86	3,78	3,69	3,60
12	9,33	6,93	5,95	5,41	5,06	4,82	4,64	4,50	4,39	4,30	4,16	4,01	3,86	3,78	3,70	3,62	3,54	3,45	3,36
13	9,07	6,70	5,74	5,21	4,86	4,62	4,44	4,30	4,19	4,10	3,96	3,82	3,66	3,59	3,51	3,43	3,34	3,25	3,17
14	8,86	6,51	5,56	5,04	4,69	4,46	4,28	4,14	4,03	3,94	3,80	3,66	3,51	3,43	3,35	3,27	3,18	3,09	3,00
15	8,68	6,36	5,42	4,89	4,56	4,32	4,14	4,00	3,89	3,80	3,67	3,52	3,37	3,29	3,21	3,13	3,05	2,96	2,87
16	8,53	6,23	5,29	4,77	4,44	4,20	4,03	3,89	3,78	3,69	3,55	3,41	3,26	3,18	3,10	3,02	2,93	2,84	2,75
17	8,40	6,11	5,18	4,67	4,34	4,10	3,93	3,79	3,68	3,59	3,40	3,31	3,16	3,08	3,00	2,92	2,83	2,75	2,65
18	8,29	6,01	5,09	4,58	4,25	4,01	3,84	3,71	3,60	3,51	3,37	3,23	3,08	3,00	2,92	2,84	2,75	2,66	2,57
19	8,18	5,93	5,01	4,50	4,17	3,94	3,77	3,63	3,52	3,43	3,30	3,15	3,00	2,92	2,84	2,76	2,67	2,58	2,49
20	8,10	5,85	4,94	4,43	4,10	3,87	3,70	3,56	3,46	3,37	3,23	3,09	2,94	2,86	2,78	2,69	2,61	2,52	2,42
21	8,02	5,78	4,87	4,37	4,04	3,81	3,64	3,51	3,40	3,31	3,17	3,03	2,88	2,80	2,72	2,64	2,55	2,46	2,36
22	7,95	5,72	4,82	4,31	3,99	3,76	3,59	3,45	3,35	3,26	3,12	2,98	2,83	2,75	2,67	2,58	2,50	2,40	2,31
23	7,88	5,66	4,76	4,26	3,94	3,71	3,54	3,41	3,30	3,21	3,07	2,93	2,78	2,70	2,62	2,54	2,45	2,35	2,26
24	7,82	5,61	4,72	4,22	3,90	3,67	3,50	3,36	3,26	3,17	3,03	2,89	2,74	2,66	2,58	2,49	2,40	2,31	2,21
25	7,77	5,57	4,68	4,18	3,85	3,63	3,46	3,32	3,22	3,13	2,99	2,85	2,70	2,62	2,54	2,45	2,36	2,27	2,17
26	7,72	5,53	4,64	4,14	3,82	3,59	3,42	3,29	3,18	3,09	2,96	2,81	2,66	2,58	2,50	2,42	2,33	2,23	2,13
27	7,68	5,49	4,60	4,11	3,78	3,56	3,39	3,26	3,15	3,06	2,93	2,78	2,63	2,55	2,47	2,38	2,29	2,20	2,10

Tabla 28.2. Tablas de distribución de la F (a) probabilidad 99% (p = 0,01) *(cont.)*

	gl Numerador																		
gl Numerador	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	∞
28	7,64	5,15	4,57	4,07	3,75	3,53	3,36	3,23	3,12	3,03	2,90	2,75	2,60	2,52	2,44	2,35	2,26	2,17	2,06
29	7,60	5,42	4,54	4,04	3,73	3,50	3,33	3,20	3,09	3,00	2,87	2,73	2,57	2,49	2,41	2,33	2,23	2,14	2,03
30	7,56	5,39	4,51	4,02	3,70	3,47	3,30	3,17	3,07	2,98	2,84	2,70	2,55	2,47	2,39	2,30	2,21	2,11	2,01
40	7,31	5,18	4,31	3,83	3,51	3,29	3,12	2,99	2,80	2,80	2,66	2,52	2,37	2,29	2,20	2,11	2,02	1,92	1,80
60	7,08	4,98	4,13	3,65	3,34	3,12	2,95	2,82	2,72	2,63	2,50	2,35	2,20	2,12	2,03	1,94			
120	6,85	4,79	3,95	3,48	3,17	2,96	2,79	2,66	2,56	2,47	2,34	2,19	2,03	1,95	1,86	1,76	1,66	1,53	1,38
∞	6,63	4,61	3,78	3,32	3,02	2,80	2,64	2,51	2,41	2,32	2,18	2,04	1,88	1,79	1,70	1,59	1,47	1,32	1,00
Tablas de distribución de la F *(cont.)* probabilidad 95% (p = 0,05)																			
1	161,4	199,5	215,7	224,6	230,2	234,0	236,8	238,9	240,5	241,9	243,9	245,9	248,0	249,1	250,1	251,1	252,2	253,3	254,3
2	18,51	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,35	19,37	19,38	19,40	19,41	19,43	19,45	19,45	19,46	19,47	19,48	19,49	19,50
3	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81	8,79	8,74	8,70	8,66	8,64	8,62	8,59	8,57	8,55	8,53
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00	5,96	5,91	5,86	5,80	5,77	5,75	5,72	5,69	5,66	5,63
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77	4,74	4,68	4,62	4,56	4,53	4,50	4,46	4,43	4,40	4,36
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,10	4,06	4,00	3,94	3,87	3,84	3,81	3,77	3,74	3,70	3,67
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68	3,64	3,57	3,51	3,44	3,41	3,38	3,34	3,30	3,27	3,23
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,60	3,44	3,39	3,35	3,28	3,22	3,15	3,12	3,08	3,04	3,01	2,97	2,93
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18	3,14	3,07	3,01	2,94	2,90	2,86	2,83	2,79	2,75	2,71
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02	2,98	2,91	2,85	2,77	2,74	2,70	2,66	2,62	2,58	2,64
11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	3,01	2,95	2,90	2,85	2,79	2,72	2,65	2,61	2,57	2,53	2,49	2,45	2,40
12	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,91	2,85	2,80	2,75	2,69	2,62	2,54	2,51	2,47	2,43	2,38	2,34	2,30

13	4,67	3,81	3,41	3,18	3,03	2,92	2,83	2,77	2,71	2,67	2,60	2,53	2,46	2,42	2,38	2,34	2,30	2,25	2,21
14	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,76	2,70	2,65	2,60	2,53	2,46	2,39	2,35	2,31	2,27	2,22	2,18	2,13
15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,71	2,64	2,59	2,54	2,48	2,40	2,33	2,29	2,25	2,20	2,16	2,11	2,07
16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,66	2,59	2,54	2,49	2,42	2,35	2,28	2,24	2,19	2,15	2,11	2,06	2,01
17	4,45	3,59	3,20	2,96	2,81	2,70	2,61	2,55	2,49	2,45	2,38	2,31	2,23	2,19	2,15	2,10	2,00	2,01	1,96
18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,58	2,51	2,46	2,41	2,34	2,27	2,19	2,15	2,11	2,06	2,02	1,97	1,92
19	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	2,63	2,54	2,48	2,42	2,38	2,31	2,23	2,16	2,11	2,07	2,03	1,98	1,93	1,88
20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,51	2,45	2,39	2,35	2,28	2,20	2,12	2,08	2,04	1,99	1,95	1,90	1,84
21	4,32	3,47	3,07	2,84	2,68	2,57	2,49	2,42	2,37	2,32	2,25	2,18	2,10	2,05	2,01	1,96	1,92	1,87	1,81
22	4,30	3,44	3,05	2,82	2,66	2,55	2,46	2,40	2,34	2,30	2,23	2,15	2,07	2,03	1,98	1,94	1,89	1,84	1,78
23	4,28	3,42	3,03	2,80	2,64	2,53	2,44	2,37	2,32	2,27	2,20	2,13	2,05	2,01	1,96	1,91	1,86	1,81	1,76
24	4,26	3,40	3,01	2,78	2,62	2,51	2,42	2,36	2,30	2,25	2,18	2,11	2,03	1,98	1,94	1,89	1,84	1,79	1,73
25	4,24	3,39	2,99	2,76	2,60	2,49	2,40	2,34	2,28	2,24	2,16	2,09	2,01	1,96	1,92	1,87	1,82	1,77	1,71
26	4,23	3,37	2,98	2,74	2,59	2,47	2,39	2,32	2,27	2,22	2,15	2,07	1,99	1,95	1,90	1,85	1,80	1,75	1,69
27	4,21	3,35	2,96	2,73	2,57	2,40	2,37	2,31	2,25	2,20	2,13	2,06	1,97	1,93	1,88	1,84	1,79	1,73	1,67
28	4,20	3,34	2,95	2,71	2,56	2,45	2,36	2,29	2,24	2,19	2,12	2,04	1,96	1,91	1,87	1,82	1,77	1,71	1,65
29	4,18	3,33	2,93	2,70	2,55	2,43	2,35	2,28	2,22	2,18	2,10	2,03	1,94	1,90	1,85	1,81	1,75	1,70	1,64
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,33	2,27	2,21	2,16	2,09	2,01	1,93	1,89	1,84	1,79	1,74	1,68	1,62
40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,25	2,18	2,12	2,08	2,00	1,92	1,84	1,79	1,74	1,69	1,64	1,58	1,51
60	4,00	3,15	2,76	2,53	2,37	2,25	2,17	2,10	2,04	1,99	1,92	1,84	1,75	1,70	1,65	1,59	1,53	1,47	1,39
120	3,92	3,07	2,68	2,45	2,29	2,17	2,09	2,02	1,96	1,91	1,83	1,75	1,66	1,61	1,55	1,50	1,43	1,35	1,25
∞	3,84	3,00	2,60	2,37	2,21	2,10	2,01	1,94	1,88	1,83	1,75	1,67	1,57	1,52	1,45	1,39	1,32	1,22	1,00

Entre los controles de calidad de la fiabilidad de la pipeta se incluyen los siguientes:

1. Asegurarse de que todos los materiales que van a usarse están a temperatura ambiente.
2. Registrar el peso de un vaso de precipitado empleando una balanza de precisión sensible a 0,1 mg.
3. Registrar la temperatura de un tubo de agua destilada, rellenar la pipeta con el agua, limpiar el exterior de la punta y dispensar el agua en el vaso ya pesado con la punta tocando el lateral del vaso.
4. Registrar el peso del vaso más el agua y calcular el peso del agua.
5. Calcular el volumen (en µl) a partir del peso (en mg) y dividirlo por el factor de la temperatura ambiente (tabla 28.3).
6. Repetir el procedimiento diez veces, cambiando la punta cada vez.
7. Calcular la media, la DE y el CV del volumen dispensado. A partir de la media, calcular el porcentaje de desviación del volumen esperado mediante la fórmula:

$$\frac{\text{Volumen esperado} - \text{Volumen suministrado}}{\text{Volumen esperado}} \times 100$$

Para procedimientos rutinarios, no debería diferir más de un 1,5%. El CV debería ser inferior al 1%.

AUTODILUYENTES

Los sistemas autodiluyentes proporcionan una dilución constante de la sangre con el reactivo mediante un proceso simple. Para evaluar su exactitud, se requiere una pipeta calibrada de 0,2 ml y un frasco graduado de 50 ml. Se dispone de un equipo certificado comercial que se ajusta a estas medidas de acuerdo con los estándares nacionales; por otra parte la exactitud se puede evaluar por el procedimiento descrito previamente.

Mezclar bien una muestra de 2-3 ml de sangre completa fresca y lisada (v. págs. 240-241). Seguidamente, diluir manualmente 1:251 en reactivo de cianometahemoglobina (v. pág. 25) empleando una pipeta calibrada y el frasco graduado. Al mismo tiempo, diluir una muestra de sangre en solución de cianometahemoglobina, por duplicado, mediante el autodiluyente. Leer la absorbancia de cada solución a 540 nm en un espectrofotómetro. La dilución mediante el autodispensador se obtiene de la fórmula:

$$A_1 \times \frac{\text{dilución (es decir, 1:251)}}{A_2}$$

donde A_1 = absorbancia a 540 nm de la dilución manual y A_2 = absorbancia a 540 nm de la muestra autodiluida.

Si está indicado, se debería hacer un ajuste apropiado al autodiluyente de acuerdo con las instrucciones del fabricante o aplicar un factor de corrección cuando se emplee el autodiluyente.

Tabla 28.3. Factor de la temperatura ambiente para la corrección de la razón peso:volumen

Temperatura (°C)	Factor de volumen
18	0,9986
19	0,9984
20	0,9982
21	0,9980
22	0,9978
23	0,9976
24	0,9973
25	0,9971
26	0,9968
27	0,9965
28	0,9963
29	0,9960
30	0,9957

MICROSCOPIO

Componentes del microscopio

Los principales componentes de la mayoría de los microscopios rutinarios se ilustran en la figura 28.2. Los objetivos están habitualmente marcados con su poder de magnificación, pero las lentes más antiguas pueden estar marcadas por su longitud focal. Las equivalencias aproximadas son las siguientes:

Longitud focal (mm)	*Magnificación*
2	×100
4	×40
16	×10
40	×4

La distancia de trabajo del objetivo es la distancia entre el objetivo y el objeto que se visualiza. Cuanto mayor es el poder de magnificación del objetivo, más pequeña es la distancia de trabajo:

Objetivo	*Distancia de trabajo*
×10	5-6 mm
×40	0,5-1,5 mm
×100	0,15-0,20 mm

Estas especificaciones indican que cuando se usa un cubreobjetos, si es demasiado grueso, puede que no sea posible enfocar con elevada magnificación. Por ello, el cubreobjetos no debería tener un grosor mayor de 0,15 mm para el examen de preparaciones cubiertas mediante el objetivo de inmersión en aceite ×100. Además, si el cristal del portaobjetos es demasiado grueso, podría impedir el enfoque correc-

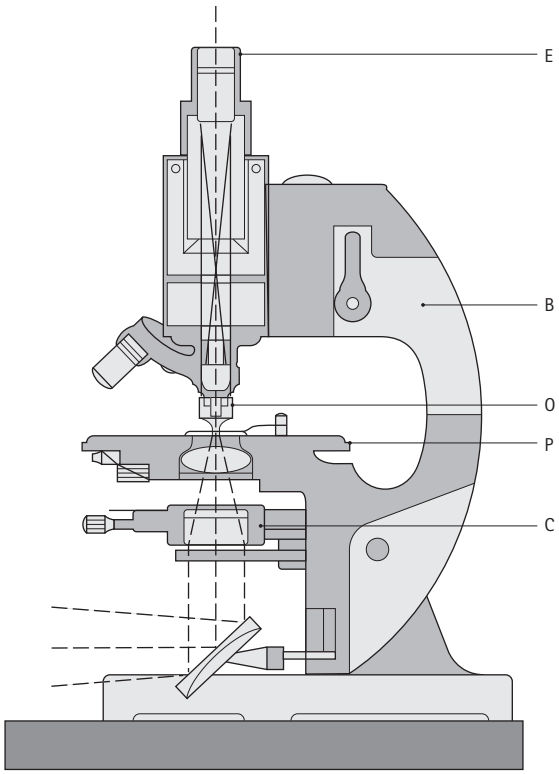


Figura 28.2. Corte transversal de un microscopio, mostrando sus componentes. B, brazo; C, condensador; E, oculares; O, objetivo; P, platina mecánica. La línea discontinua indica la trayectoria de la luz. Obsérvese que se muestra una fuente de luz externa que se dirige al interior del microscopio. En la mayoría de los microscopios modernos hay una lámparaa incluida en la base.

to de la trayectoria de la luz a través del condensador hasta el objeto, como se describe más adelante.

Ajuste de la iluminación del microscopio

1. Si el microscopio requiere una fuente de iluminación externa, usar el espejo de la base dirigiendo la luz hacia el condensador. Si la fuente lumínica está incluida en el microscopio, asegurarse de que el voltaje de la lámpara esté bajo antes de encender el microscopio; entonces, subir la lámpara hasta el 70% de la potencia máxima.
2. Colocar un portaobjetos de un frotis sanguíneo con un cubreobjetos sobre la platina.
3. Bajar el condensador, abrir el diafragma completamente, y enfocar la preparación del portaobjetos con el objetivo ×10.
4. Comprobar que los oculares están ajustados a la distancia interpupilar del observador y que la muestra está enfocada para cada ojo, mediante rotación del mecanismo de enfoque de los oculares ajustables.
5. Cerrar el diafragma y elevar el condensador lentamente hasta que el borde del círculo de luz esté nítidamente enfocado.
6. Usando la rueda para centrar el condensador, ajustar su posición para que el círculo de luz esté en el centro del campo.
7. Abrir completamente el diafragma para que la luz cubra el campo de visión completo.
8. Retirar los oculares, de manera que la lente superior del objetivo esté completamente ocupada por un círculo de luz. Cerrar el diafragma lentamente hasta que el círculo de luz ocupe dos tercios de la superficie.
9. Recolocar los oculares, volver a enfocar la muestra y si es necesario volver a ajustar la apertura del condensador y el brillo de la lámpara para obtener la imagen más nítida posible.

Examen de portaobjetos

Bajo aumento (×10). Empezar con el objetivo justo sobre la preparación del portaobjetos. Seguidamente, elevar el objetivo con los tornillos de enfoque macrométrico hasta que se vea una imagen clara por los oculares. Si la iluminación es insuficiente, subir el condensador ligeramente.

Gran aumento (×40). Subir el condensador hasta la mitad; bajar el objetivo hasta que esté justo sobre la preparación del portaobjetos. Usar el enfoque macrométrico para elevar el objetivo muy lentamente hasta que se obtenga una imagen borrosa. Seguidamente, enfocar usando el enfoque micrométrico. Si es necesario, elevar el condensador para obtener la iluminación suficiente.

Aceite de inmersión (×100). Colocar una pequeña gota de aceite de inmersión en la parte que debe examinarse. Subir el condensador tanto como se pueda. Bajar el objetivo hasta que esté en contacto con el aceite. Colocarlo tan cerca como sea posible del portaobjetos, pero evitando presionar la preparación. Mirar a través de los oculares y girar el enfoque micrométrico hasta que la imagen esté enfocada.

Después de usar el objetivo con aceite de inmersión, para evitar rayar la lente o cubrir la lente de ×40 con aceite, primero girar el objetivo ×10 (o un espacio sin lente en el revolver) para colocarlo en la zona central antes de quitar el portaobjetos. Siempre que sea posible, emplear aceite sólo cuando sea esencial (p. ej., determinación de las especies de malaria), y examinar los frotis de sangre para recuento diferencial de leucocitos con la lente de ×40 sin aceite.

MANTENIMIENTO RUTINARIO DEL MICROSCOPIO

El microscopio es un instrumento delicado que debe ser manejado con cuidado. Debe instalarse en un entorno limpio lejos de productos químicos, luz solar directa, fuentes de calor o humedad. Si la platina está contaminada con solución salina, debe limpiarse inmediatamente para evitar corrosión. Incluso en un clima templado, la humedad y las elevadas temperaturas causan crecimiento de hongos, que pueden dañar las superficies ópticas. Dado que el almacenaje en un compartimento cerrado promueve el crecimiento de hongos, no debe almacenarse en su caja de madera sino dejarse de pie sobre la encimera protegido por una funda de plástico ligera.

Después de usar las lentes, limpiar el objetivo de inmersión con un paño para lentes, un papel absorbente, un paño sua-

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

ve o algodón médico. Si las otras lentes se han manchado con aceite, limpiarlas con un poco de tolueno o una solución de éter de petróleo al 40%, etanol al 40% y éter al 20%.

Las lentes nunca deben sumergirse en alcohol, porque éste puede disolver el pegamento.

Limpiar las partes no ópticas con detergente suave y quitar la grasa o aceite con éter de petróleo, seguido de etanol al 45% en agua. Quitar el polvo del interior y exterior de los oculares con soplador o cepillo suave de pelo de camello.

Limpiar el condensador del mismo modo que las lentes con un paño o tejido suave humedecido con tolueno y limpiar el espejo (si existe) con un paño suave humedecido con alcohol al 5%. El diafragma es muy delicado, y si se daña o se oxida mucho, generalmente necesita ser reparado.

No forzar nunca los mandos. Si notamos dificultad al mover los tornillos de enfoque o la platina mecánica, lubricarlos con una gota de aceite para máquinas. Todas las partes móviles accesibles deberían limpiarse de vez en cuando y ser engrasadas para protegerlas de la corrosión. No emplear aceites vegetales porque se secan y endurecen. Mantener siempre la superficie fija de la platina seca porque el movimiento de portaobjetos húmedos requiere más fuerza, lo que podría dañar la platina mecánica.

Climas cálidos y húmedos

En los climas cálidos y húmedos, si no se toman precauciones, pueden desarrollarse hongos en los microscopios (especialmente en la superficie de las lentes y en las ranuras de los tornillos) con lo que los instrumentos quedarán pronto inutilizables. Esto puede prevenirse como sigue.

Todas las tardes, colocar el microscopio en una funda hermética al polvo junto con gel de sílice. Cuando sea necesario, secar el gel de sílice y reutilizarlo. Un método alternativo es colocar el microscopio en un armario templado. Éste es un armario con una puerta con cierre ajustado, calentado por una bombilla de luz de 40 watios. Comprobar que la temperatura en el interior del armario sea al menos 5 °C más cálida que la del laboratorio, pero tener cuidado de que no esté excesivamente caliente.

Climas cálidos y secos

En climas cálidos y secos, el principal problema es el polvo. Las finas partículas penetran entre las roscas de los tornillos y bajo las lentes. Esto puede evitarse como sigue:

1. Mantener el microscopio, siempre que no se use, bajo una funda de plástico impermeable al polvo.
2. Al final de la jornada, limpiar el microscopio minuciosamente echándole aire con una perilla de goma.
3. Terminar de limpiar las lentes con un cepillo para lentes o un pincel fino. Si persisten partículas de polvo sobre la superficie de los objetivos, eliminarlas con un papel limpio.

SANGRE DESFIBRINADA

Para obtener glóbulos rojos no coagulados sin añadir anticoagulantes (p. ej., para la investigación de ciertos tipos de anemia hemolítica) la muestra puede ser desfibrinada. Esto puede realizarse colocando la sangre en un recipiente tal como un frasco cónico que contenga una vara de cristal central sobre la que se han fusionado pequeños trozos de capilares de cristal (fig. 28.3). La sangre es batida alrededor de la vara central por una rotación moderadamente rápida del frasco. La coagulación es normalmente completa en 5 min, quedando la mayoría de la fibrina en la vara central. Cuando la formación de fibrina parece completa, debe retirarse la vara de cristal del frasco. La morfología de los glóbulos rojos (y también de los leucocitos) queda bien preservada. Si también se requiere suero, la sangre desfibrinada puede centrifugarse y el suero puede obtenerse rápidamente y en volúmenes relativamente grandes.

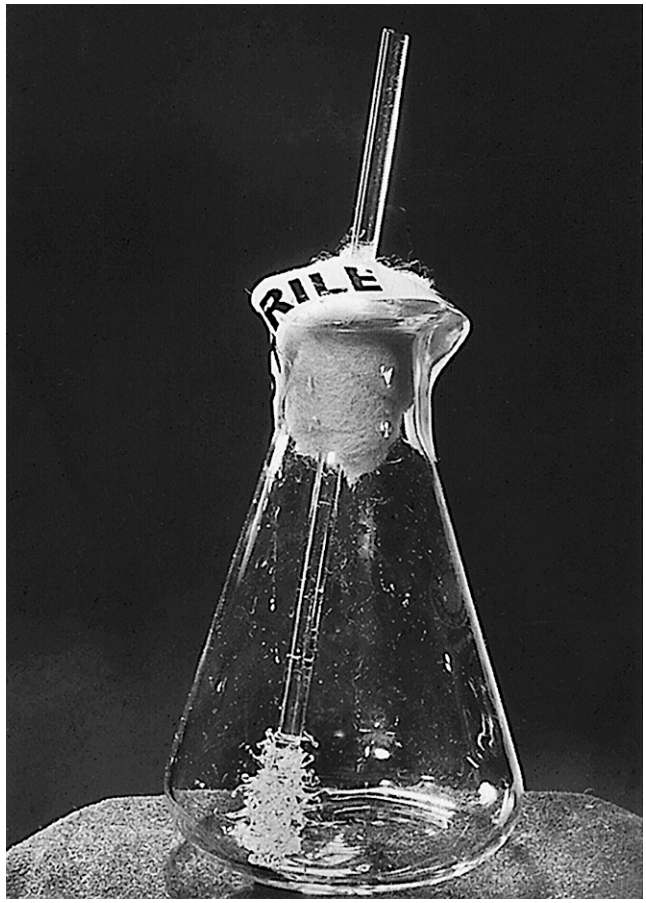


Figura 28.3. Recipiente para desfibrinación de 10–50 ml de sangre. La vara de cristal tiene unos pequeños fragmentos de capilares de cristal alargados fusionados en su extremo inferior.

BIBLIOGRAFÍA

1. Moore HC, Mollison PL 1976 Use of a low-ionic-strength medium in manual tests for antibody detection. Transfusion 16:291.
2. Hendry EB 1961 Osmolarity of human serum and of chemical solutions of biological importance. Clinical Chemistry 7:156.
3. World Health Organization 1977 The SI for the health professions. WHO, Geneva.

Índice alfabético

Nota: Los números en cursiva hacen referencia a figuras y tablas.

A
ABC de la informática médica, 542
ABI 3700 ADN Analyser, 495
Absorbancia (δA), 24, 25, 26, 122
Absorción del hierro de la dieta, 114
Acantocitos, 71, 82, *85*, *87, 88*
Acantocitosis, 81, *88*
ACD. Véase *Ácido citrato dextrosa*
Acetato
  de celulosa, *241-4*
  de cinc, 169, 253
  de sodio, 119
Acetilfenilhidrazina, 169
Ácido
  acético, 163
    glacial, 41
  aminolevulínico, 169, 170
  ascórbico, 147
  citrato dextrosa (ACD), 2, 5
  cítrico monohidrato, 119
  desoxirribonucleico (ADN)
    análisis, 263, 272, 333, 357, 477-8, 483, 524, 582
      de la secuencia, 485
    analizador, 496
    complementario (ADNc), 478, 507
    concentración, 499
    de las células nucleadas, 45
    extracción, 478
    fetal, 465
    fragmentos, 496
    genómico, 479, 497-9
    genotipificación de los eritrocitos, 456
    marcadores, 496
    molécula, 477
    polimerasa, 478
    recombinante, 507, 517
    reticulocitos, 35
    secuencia, 479-494
    síntesis, 140-147
    Taq polimerasa, 479, 491, *492*, 504
    técnicas de amplificación, 465
    tecnología, 239
    tinción con plata, 502
  etilendiaminotetraacético (EDTA), 2, 5-6, *7*, 24, 51, 97, 120, 171, 182, 271, 288, 426, 512, 513, 564, 580
    anticoagulante, 103
    sal
      dipotásica, 5
      tripotásica, 5
  flufenámico, 221
  folínico, 148
  mefenámico, 221
  metilmalónico, (AMM), 139-40, 152
    urinario, 146
  p-aminosalicílico, 221
  perclórico (APC), 191
  peryódico de Schiff (PAS), 268
    reacción, 277-279
    tinción, *279*
  pteroilglutámico (APG), 146, 150
  ribonucleico (ARN)
    análisis, 300
    proteínas ligadas, 115
    recuento de plaquetas, 45
    reticulocitos, 32, 35
  sulfúrico, 120
  tartárico, 277
  tricloroacético (TCA), 199
Acidosis, 200
Aclorhidria, 156
Acreditación, 547-9
Activación
  de las enzimas fosfolipasa (PLA2), 328
  del factor tisular (FT), 328
Activador
  del plasminógeno, (AP), 14, 331, 390, 392
    tipo urocinasa (uPA)
    tisular recombinante (APT-r), 409
  tisular del plasminógeno (tPA), 329, 331, 392
Actividad
  de la fosfatasa alcalina de los neutrófilos (FAG), 276
  de unión de colágeno (FVW:CB), 359, 362
  del cofactor de la ristocetina (VWF:RCo), 359
  eritropoyética, 32, 171
Acumulación, 540
Acúmulos dispersos, *92*
Adamantil dioxetano fosfato, 149
ADE. Véase *Amplitud de la distribución eritrocítica*
Adenosina
  5'-difosfato (ADP), 358
  monofosfato cíclico (AMPc), 328
Adhesión de las plaquetas, *97*
Administration of Radioactive Substances Advisory Committee (ARSAC), 306
ADN. Véase *Ácido desoxirribonucleico*
ADPasa (adenosina difosfatasa), 326
Advanced Applied Biosystems (ABI), 470
AET. Véase *Bromuro de 2-aminoetil*-iso-*tiouronio*
Agar citrato, *246*
Aglutinación en columnas, *454*, 450, 457, 466
Aglutininas, 40
  frías, 5, 14
Agrupación según el ABO, 214, 452, 463
Agrupamiento D, 453-57, 464
Agujas, 1-4
  autorretenedoras, 310
  de microtrepanación, 108
  de Salah, 101, *102*
  desechables, 2
  Islam para aspiración de medula ósea, 102
  Klima, 101, *102*
  Osgood, 108
  palomilla, 2, 310
  Vim-Silverman, 108
Alarmas en los recuentos sanguíneos automatizados, 47
Albúmina
  de suero bovino (ASB), 119, 439
  sérica humana (ASH), 310
Alcohol
  absoluto, 55
  etílico, 55
  metílico, 55
Aldolasa, *187*
Aloanticuerpos, 434, 437
Alteraciones cuantitativas de los eritrocitos, 521-2
Altos del Golán, 133
American
  Association of Blood Banks (AABB), 425, 450
  Diagnostica, 388

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Aminoácido disulfuro, 152
AMM. Véase *Ácido metilmalónico*
Amplitud de la distribución eritrocítica (ADE), 255
Anafilaxis, 471
Análisis
  anticardiolipina, 384
  citogenético, 100
    hibridación por fluorescencia *in situ* (FISH), 488, *489*
    leucemia, 485-96
    linfoma 485-96
  cromogénico, 390
  DAFO, 536
  de células falciformes, *251, 482*
  de Clauss, 344-5, 356
  de cobalamina
    causas, 148
    en suero, 145
    estándares, 145,
    exactitud, 145, 147
    investigación, 141, 144-5, 145-8
    métodos, 148
    precisión, 145
  de inmunoabsorción
    ligada a enzimas (ELISA), 117, 259, 332, 385, 408, 517, 582
    ligado a la enzima Clq, 438
  de la altura del impulso, 39
  de la forma de la onda, 339, 340
  de las enzimas eritrocitarias, 192-5
  de los datos, 566
    EQA, 569
  de los ensayos, 339-42
  de repeticiones cortas en tándem (STR), 480, *497*
  del cofactor de la ristocetina, 360, *362*, 372
  del fibrinógeno, 5, 14, 19, 59, 163, 344
  del folato, 7, 528
    causas, 148
    en suero, 145
    eritrocitos, 141, 143
    estándares, 145
    exactitud, 145, 146
    métodos, 148-9
    precisión, 145, 146
  del polimorfismo de conformación de cadena única (SSCP), 480, *496*
  Maipa, 442-3
  molecular
    análisis del ADN, 477-8
    extracción del ADN, 478
    reacción en cadena de la polimerasa (PCR), 478-81
  por encima del tiempo, *340*, 340
Analizadores
  automatizados, 15
    de la coagulación, 334
  de acceso aleatorio, 149
  de recuentos sanguíneos automatizados, 567
  IL ACL, 339
  portátil, 129
  Proto Fluor Z, 129
Anemia, 523
  aplásica, 72, 86, 100, 101, 139, 140, 223, 527
  autoinmune «idiopática» por anticuerpos calientes, *179*
  clínica, 24
  congénita eritropoyética, 139, 140
  de Blackfan-Diamond, 239
  de células
    en espuela, 81
    falciformes, 29, *83-4*, *89*, 164, 318
  de Fanconi, 239
  del deportista, 18
  diseritropoyética congénita, 72-73
    de tipo II (ADCII), 182
  ferropénica, 72-3, *73-5*, *76*, *89*, 113-33, 181, 521
    capacidad de fijación del hierro, 124
    determinación de la capacidad no saturada de fijación de hierro, 124-5
    estado del hierro, 116
    ferritina sérica, 117
    hierro sérico, 121-4
    inmunoanálisis de la ferritina, 117-22
    metabolismo del hierro, 113-6
    protoporfirina eritrocitaria (PE), 129
    saturación de la transferrina, 124, 126
    transferrina sérica, 124-9
  fetal, 466
  hemolítica, 33, 70, 77-78, 177, 186, 210, 221, 521, 527, 602
    aloinmunitaria, 206
    autoinmune, 72, 182-183, 318, (AHA), 206
    inducida por fármacos, 220, 222
    catabolismo de la hemoglobina, 168-9
    con cuerpos de Heinz, 236
    con hemoglobina, 77, *78*
    congénita, 72
    examen del plasma, 167-8
    haptoglobina sérica 164-7, *165-6*
    hemoglobina plasmática, 163-4
    hemopexina sérica, 167
    hemosiderina en la orina, 168
    hereditaria
      análisis
        de la piruvatocinasa, 195-6
        de las enzimas eritrocitarias, 192-5
        de las proteínas de la membrana, 186
      autohemólisis, 184-6
      criohemólisis, 184
      defectos
        de la membrana, 178
        del metabolismo eritrocítico, 190,
      detección de los déficits enzimáticos, 186-8
      2, 3-difosfoglicerato, 198-200
      fragilidad osmótica, 178-82
      glutatión, 196-8
      no esferocítica, *179*
      prueba
        de fijación al colorante, 182-3
        de la citometría de flujo, 182-3
        de la pirimidina-5'-nucleotidasa (P5N), 191-2
        de reducción de la metahemoglobina, 189-90
        del tiempo de lisis con glicerol, 183-4
      inducida por oxidantes, 78, 222-23
      inmune, 90
      investigación, 162-3
      microangiopática, 72, *70*, 70,
      pigmentos de hemoglobina anómalos, 171-174
      porfirinas, 169-171
      poscirugía cardíaca, *70*
    hemolítica adquirida
      evaluación de la extensión sanguínea, 205
      hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), 223-8
      inducida por oxidantes, 222-23
      inmunitaria, 205-22
      mecánica, 223
      microangiopática, 223
      probabilidad, 205
    hipocrómica, 29
    leucoeritroblástica, 86
    macrocítica, 29, 139, 524, 527
    megaloblástica, 72, 74, 74, 92, 102, 139-57, 223, 521
      análisis
        de fijación competitiva a proteínas, 149
        de la B_{12} sérica, 149-50
        de la holotranscobalamina, 156-7
      características hematológicas, 140-1
      déficit de folato, 140, 141-4, 146
      determinación de la homocisteína, 152-4
      investigación
        de la absorción de B_{12}, 155
        de la sospecha de cobalamina, 139, 141-4, 147-8
      medición de la transcobalamina, 156
      métodos
        de análisis
          de la cobalamina, 148-9
          del folato, 148-9
            eritrocítico, 150-2
            sérico, 150
      pruebas para los metabolitos, 152
    microcítica, 523, *523*, 24, 527
    normocítica, 524, 25, *525*,
    normocrómica, *525*
    perniciosa, *72*, 145, 154, 169
    por enfermedad crónica (AEC), *116*
    sideroblástica, *269*
      adquirida, *75*, 75, *76*
Anisocitosis, 58, 71, *71-4*, *75*, *77*
Anisocromía, 69, *72*, 74, *75*
Ankirina, 182
Anomalía
  de Alder-Reilly, *91*
  de May-Hegglin, 91, 96
Anorexia nerviosa, 106
ANOVA, 595
Antec-DuPont, 478
Anti-ciclina D1, 298

Anticoagulantes, 5-6, 590-91
Anticuerpo
  anticardiolipina (AACL), 370
  de Paul-Bunnell, 516
  marcador, 359
  monoclonal (AcMo), 227
Anticuerpos
  ABO, 413
  anti-A, 428
  anti-B, 428
  anti-C, 208
  anti-Ce, 464
  anticomplemento, 208
  anti-E, 464
  anti-factor intrínseco (AcFI), 154
  anti-Fya, 464
  anti-Jka, 464
  anti-Lea, 428
  anti-P, 428
  antipenicilina, 221
  anti-PP1Pk, 428
  anti-Tja, 428
  de Donath-Landsteiner (D-L), 209
  de *GTI Pak Plus*, 443
  dependientes de fármacos, 437
  Duffy, 420, 423
  HLA, 437
  IgG, 464
  incompletos, 211
  independientes de fármacos, 221
  inducidos por fármacos, 437, 438
  inmunoglobulina M (IgM), 526
  Jk, 421
  Kell, 420
  Kidd, 420, 420
  Leb, 428
  Lewis, 418
  Lutheran, 421
  monoclonales, 100
    (AcMo), 287
  penicilina, 221
  policlonales, 100
  Rh, 423
Antígenos
  ABO, 414-7
  crípticos, 438
  de neutrófilos humanos (HNA), 434
  Duffy, 420
    receptores para las quimiocinas (ADRQ), 420
  Kidd, 420
  Lewis, 418
  MNS, 420
  ocultos, 438
  plaquetarios humanos (HPA), 434
Antiglobulina humana (AGH), 211, 458
Anti-Lu^a, 421-2
Anti-Lu^b, 421-2
α_2-antiplasmina (AP), 331, 393, 394
α_1-antitripsina, 514
Antitrombina (AT), 5, 14, 378-70, 384, 403
Aparición de oquedades *(pitting)*, 58
Apófisis espinosas, punción, 101
Apoptosis, 7, 108
Aprotinina, 410
Archives of Pathology and Laboratory Medicine, 550
Área de absorbancia milimolar, 25
ARN mensajero (ARNm), 115, 237, 480
ASB. Véase *Albúmina de suero bovino*
Asignación del genotipo, 376
Aspectos macroscópicos de la aglutinación, *429*
Aspiración, 100
Aspirados esplénicos, parásitos, 60
Atrofia esplénica, 84-5
Auditoría del laboratorio, 547-9
Autoaglutinación, *85*
  y cilindros, 85
Autoanticuerpos, 428, 436-39
  antiplaquetarios, 97
  calientes, 207, 214
  fríos, 208
  granulocíticos, 437
  IgA, 220
Autoclave, 1
Autodiluyentes, 600
Autopruebas del paciente, 546
Axis-Shield, 153
Azatioprina, 141
Azida sódica, 24, 26, 362
Azida-hemoglobina, 24
Azidotimidina (AZT), 141
Azul
  de cresil brillante, 32, 271
  de metileno, 32, 57, 65, 189
    policromo, 53

B
B_{12} radioactiva, 155
Babesiae, 60, 66
Babesiosis, 66
Bacterias, 91, 91, *92*
Banda 3, 182
Basofilia, 522
Basófilos, 93, *94*, 523
Bastones de Auer, 70, *273*, *280*, 281, 531
Bayer
  Centaur, 149, 153
  immuno 1, 150
Bayer-Technicon Systems, 37
Beckman-Coulter
  Access, 150
  LH750, 43
Bencidina, 163
Bilirrubina, 148, 169
Bioensayo en línea paralela de factor VII, *350*
Biomerieux, 339
Biopsia
  de la cresta ilíaca, 100, *109, 111*
  por trepanación, 99, 106, 108
Bio-Rad, 153
Borato, 119
Borde celular, 77
British Committee for Standards in Haematology (BCSH), 295, 425, 450, 546, 562
Bromuro
  de 2-aminoetil-*iso*-tiouronio (AET), 228
  de difeniltetrazolio, 187
Brugia
  malayi, 65
  timori, 65
Busulfán, 523

C
Cadena pesada de la inmunoglobulina (IgVH), 300
Calcio, 5
Calibración, 337
  de los recuentos sanguíneos automatizados, 46
  gráfico, 168, 174
  valor, 46
Calicreína, 331
Cámara de recuento de Neubauer, *579*
Cambios transitorios, 17
Cáncer hepático primario, 156
Capacidad
  de fijación del anticuerpo (CFA), 291
  insaturada de fijación de hierro (UIBC), 125, 313
  total de fijación de hierro (TIBC), 124
Caquexia, 106
Características
  morfológicas de la apoptosis, 8
  operativas del receptor (ROC), 539
Carbonato de magnesio ($MgCO_3$), 124
Carboxihemoglobina (HbCO), 19, 24, 171, 174, 272
Carcinoma de células metastásicas, 105, 523
Carcinomas, 100
CD4K 530, recuento de reticulocitos, 45
CD55, 224, 226
CD58, 226
CD59, 224
Cebadores, *492*
  específicos de la secuencia de la PCR (PCR-SPP), 444
Cefalosporinas, 221
CellVision AB, 43
Células
  asesinas naturales, 94
  contraídas, *89*
  crenadas, 81
  de Kupffer, 167
  de la fiebre glandular, 95
  de Türk, 94, *95*
  diana, 71, *825, 87*
  en casco, 81
  en erizo, 79
  en lágrima, *72*
  en lápiz, 72
  en mordisco, 81
  eritroides, maduración, 106
  falciformes, *83*, 84, *84*
  hematopoyéticas, 109
  hipocrómicas, *73, 76, 87, 89*
  mononucleares, 59
    atípicas, *95*
  no hematopoyéticas, 105
  normocíticas, *75*
  plasmáticas, 95
  sanguíneas
    concentración, 58-60

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Células *(cont.)*
separación, 58-60
seudo-Pelger, *93*
Central Laboratory of Netherlands Red Cross Blood Transfusion Service (CLB), 592
Centre for Health Planning en la Universidad de Keele, 550
Centrifugación, 103, 336
con gradiente de densidad, 288
velocidad, 592
Centrífugas, 29, 122, 124, 169, 184, 199, 215, 225, 247, 309, 334, 383, 557
Cetrimida, 41
Chance 0 Gr 1, 27
CHCM. Véase *Concentración de hemoglobina corpuscular media*
Chequeo delta, 47, 571
Cianocobalamina, 149, 155
Cianuro, 24, 173
de hemoglobina (HiCN), 163
a partir de la hemoglobina, 26
diluciones, 26
método, 24
patrón de referencia, 25-6
potásico (KCN), 149, 172, 249
y reactivo ferrocianuro, 27
y solución de ferrocianuro (Drabkin), 184
Ciclo menstrual, 130
Cilindros hemáticos, formación, 58, *95*
Cinetoplasto, 62
Citocinas, 7
Citomegalovirus (CMV), 451
Citometría de flujo, 227, 372
activación plaquetaria, 394-5
contadores diferenciales automatizados, 42
inmunofenotipación, 574
métodos, 288
multicolor, 291-93
representación de puntos, 299
utilización, 442
Citoplasma, 7, 93-5
abundante, 94, 95
basófilo, 95
encogimiento, 106
Citoquímica
eritrocítica
derivados de la hemoglobina, 270-73
sideroblastos, 266-70
siderocitos, 266-70
leucocitaria
clasificación de las leucemias, 284
esterasas, 279-80
mieloperoxidasa (MPO), 273-75
naftol AS-D cloroacetato esterasa, 280-3
reacción
de la fosfatasa ácida, 276-7
del ácido peryódico de Schiff, 277-9
reacciones citoquímicas, 284
sudán negro B (SNB), 275
tinción con toluidina azul, 283-84
Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), 422
Citrato
sódico, 6, 163
trisódico, 2, 6
Citrato-fosfato-dextrosa (CPD), 5, 151, 563
Clasificación de las anemias, 281
Clinical
and Laboratory Standards Institute (CLSI), 5, 335, 562
Benchmarking Company, 550
management unit, 550
Pathology Accreditation, 536
Clorhexidina, 2, 100
Clorhidrato de fenilhidrazina, 172
Cloroacetato esterasa, *280*
Cloroformo, 170
4-cloro-1-naftol (4CN), 273
Clorpropamida, 221
Cloruro de hemina, 24
Clostridium perfringens
lecitinasa, 76
septicemia por, 77
Coagulación
estabilidad de las pruebas, 7
intravascular diseminada (CID), 332, 385, 405
sanguínea
análisis, 332
inhibidores, 331-2
técnicas, 333
trastornos, 483-5, 521
Coagulopatías, 7
Cobas Argos 5, contador automatizado de sangre completa, 42
Cocientes
celulares, 105
leucoeritroide, 105
linfoide, 105
Código de práctica segura de laboratorio, 584
Coeficiente
de correlación, 541
de extinción (ε), 197
milimolar, 27
de variación (CV), 13-14, 36, 41, 127, 145, 538, 564
elegido (CVE), 541
College of American Pathologists, 537
Coloide etiquetado con ^{99m}Tc, 319
Colorante
azul de toluidina, 283
o-dianisidina, 165
Colorantes de Romanowsky, 6, 53-5, 70, 102, 109
Colorímetro fotoeléctrico, 24
Colorímetros, 24
Comité Européen de Normalisation (CEN), 562
Commission for Health Improvement (CHI), 550
Comparativa, 550
Complejo
B_{12} transcobalamina
I, 140
II, 140
cuaternario Xa-TF-VIIa-TFPI, 329
de ataque a la membrana (MAC), 422
fosfatasa alcalina-ligando, 149
haptoglobinas y Hb, 167
hemoglobina-haptoglobina, 116
inactivo trombina-antitrombina (TAT), 331, 395
transferrina-receptor de la transferrina, 115
Componentes del complemento, 423
Comprobación de la correlación, 568
Compuesto
de albúmina y hemo, 167
de bencidina, 163
de tetrazolio soluble (MTT), 190
Concentración
de FVW:Ag, 359-60, 362
de hemoglobina (Hb), 4, 14-16, 19, 37, 74, 116, 184, 205, 521, 563, 574
corpuscular media (CHCM), 6, 14, 16, 30, 131, 238, 309-10, 523, 568-9
amplitud de la distribución (ADH), 40-1
cambios, *17*
en cianuro de hemoglobina, 24
en el embarazo, 17
escala de color, *578*
medición, 24
método de referencia del ICSH, 29
síntesis, 41
Concentraciones moleculares, 593
Condensación de cromatina, 95, 96
Constante
de Hill (n), 201, 254
de Michaelis (Km), 195
Contador automatizado de sangre
completa, serie
H de Bayer, 42
LH 700, 42
total, Advia, 42
Contadores electrónicos, fiabilidad, 37-9
Contaje de superficie, 307
Contracción irregular, 71
Control
de anticoagulantes orales, 575
de calidad, 242, 337, 425, 513, 546
análisis de los datos, 566-9
comprobación delta, 568
de las centrífugas para lavar células, 432
de los reactivos antiglobulina, 430
materiales para el control de la calidad, 563-6
preparaciones de referencia, 563
procedimientos, 571
protocolo para los laboratorios de diagnóstico, 571-572
valoración externa de la calidad, 569-71
financiero, 537
interno de la calidad, 561
Coproporfirina, 169-70
Corel Draw Graphics Suite, 363, 365
Corrección de la casualidad, 38
Coste de las pruebas, cálculo, 537-8
Coulter
STKS, contador automatizado de sangre completa, 42
Wallace, 37
CPD. Véase *Citrato fosfato dextrosa*
Crenación, 7, *77*, 81-2, *88*
Crioglobulinas, 40
Crioglobulinemia, 58
Criohidrocitosis, 182
Crisis blástica, 94
Cristaseal®, 28

Cromatina, 94
Cromatografía, 256
  capilar en fase gaseosa, 153
  en fase líquida de alta resolución (HPLC), 139, 240, 246, 524
  en microcolumnas, 244
Cromo radioactivo (^{51}Cr), 309, 315
Cromosoma 9, loci genéticos, 415
Cuantificación, 293
  de antígenos, 291, *292*
Cuentas de látex, 39
Cuerpos
  apoptósicos, 8
  de Döhle, 91
  de Heinz, 34-5, 77, 81, 163, 222, 263, 270
  de Howell-Jolly, 46, 61, 70, 71, 84-7, *85*, 85, *87*
  de Leishman-Donovan, 62, *64*
  de Pappenheimer, 35, 70, 71, 73, *84-5*, *89*, *268*
Curva
  de disociación del oxígeno, 200-1
  de Gauss, 12, *12*
  de supervivencia de los eritrocitos con ^{51}Cr, *317*, 318
Cutánea tarda, 171
CV. Veáse *Coeficiente de variación*

D
Daño
  mecánico, 81
  oxidativo, 72
Dapsona, *81*
DDAVP (1-desamino-8-D-arginina vasopresina), 391
Decon90, 307
Déficit
  de cobalamina, 17
  de deshidrogenasa (G6PD), 162
  de folato, 140, 143-5, 146-8
  de G6PD, (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), 78, *81*, 177, 185, *187,* 187, 190, *190*, 193-5, 205, 222, 263, 270, *270,* 496
    detección de heterocigotos, 189
    prueba de detección por fluorescencia, 187
  de la 2, 3-difosfoglicerato mutasa, 200
  de P5'N, 191-2
  de piruvatocinasa (PK), *180*, 181*, 187*, 195-6
  de selenio, 78
  del factor
    IX, 375, 460
    VIII, 375, 395
Degranulación plaquetaria, 6
Deleción del pb 619, 482, *483*
Densidad óptica (DO), 25, 359
Depósito de orina, microfotografía, 168
Depósitos de hierro, 116, *116*
Derivado de dos cadenas (tcu-PA), 331
Desarrollo profesional continuo, 536
Desintegración diferencial, 308
2-desoxiG6P (2dG6P), 195
Desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), 287, *291*
Desproteinización, 199
Desviación estándar (DE), 12, 14, 538, 566, 569
Detección
  de anticuerpos, 457-9, 464
  de antígenos intracelulares, 290
  de eluidos, 217
  de la mononucleosis infecciosa, *517*
  neonatal, 252
Detectores electroópticos, 37
Determinación del fenotipo, 459
Dextrano, 59
Dextrosa, 5
Diagnostic Products Immulite 2000, 149-50, 153
Diagramas de dispersión, 43
Diaminobenzidina (DAB), 302
Diclorhidrato de *o*-fenilendiamina, 119
2,6-diclorofenolindofenol (DCIP), 582
Dietilaminoetil (DEAE) celulosa, 257
Diferencial en los recuentos sanguíneos automatizados, 42-4
DiffMaster, 43
Difosfoglicerato fosfatasa, *187*
Difosfogliceromutasa, *187*
Dilución, 27
  de radioisótopos (RID), 150
Dimetilsulfóxido (DMSO), 54, 482
Dimorfismo, 71
Directiva
  del Consejo y el Parlamento Europeo, 562
  Europea de la Sangre, 450
Directrices
  de las Canadian Health Service Organizations, 537
  para las pruebas de compatibilidad de la BCSH, 431
Diseritropoyesis, 46, 72
Disfunción plaquetaria, *369*
Disodio hidrógeno fosfato (Na_2HPO_4), 57, 251
Dispersión
  frontal (FSC/FSc), 40
  lateral (SSC/SSc), 40
  lumínica, 37
    instrumentos, 39
Dispositivos de diagnóstico médico *in vitro* (IVDMD), 562, 569
Distribución
  asimétrica, 12
  del hierro corporal, *116*
  gaussiana, 12, 538
  logarítmica normal, 12, *12*
Ditionito sódico ($Na_2S_2O_4$), 251
Ditiotreitol (DTT), 149, 220, 247
DMSO. Véase *Dimetilsulfóxido*
Documento
  de guía *ILAC G13/2000,* 549
  de la Association of Clinical Pathology Best Practice, 169
Dodecyl sulfato sódico (SDS), 186
Dosis de radiación, 593
Drabkin
  reactivo, 25, 26, 225
  solución, 184
Drew Scientific, 153
Drummond Scientific, 29

E
E170, 149
Ecarina, 383
Echis carinatus, 383
EDTA. Véase *Ácido etilendiaminotetraacético*
Efecto
  Bohr, 201
  Romanowsky, 53
Ehrlichiosis, 60, 65
Electroforesis, 164-5, 167
  alcalina de la cadena de globina, 247
  capilar, *497*
  de la cadena de globina, 247
  de la hemoglobina, 240
  en gel de poliacrilamida, 501-2
  realización, 249
Eliminación de residuos, 3, 558
Eliptocitos, 72, *76*, *79*
Eliptocitosis, 71, 78, 526
  hereditaria (ElH), *79*, 181-182, 186
ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas), 154
Elución, 316
  caliente, 217, 439
  por congelación y descongelación, 217
Elusión de éter, 439
Embarazo, 17, 133, 466
Emisor de rayos-γ, 315
EN. Véase *Eritrocitos nucleados*
Encogimiento celular, 109
Enfermedad
  cardíaca congénita, 522
  celíaca, *97*
  de Chagas, 64
  de Crohn, 94
  de Hodgkin, 108
  de la hemoglobina H, *75*, *83,* 255
  de las células falciformes, 235, 240, 251, 263, 481, 482
  de Paget, 109
  hematológica
    clasificación de las neoplasias, 529-33
    presentaciones comunes, 521
    pruebas
      específicas, 527-29
      iniciales de detección, 521-27
  hemolítica ABO, *76*
    del recién nacido (EHRN), 217, 168
  mínima residual (EMR), 287, *289*
  por depósito, 527
  por Hb H, 241, *271*
  por hemaglutinina fría crónica, *74*
  por hemaglutininas frías (CHAD), 208, 422
Enolasa, *187*
Ensayos
  amidolíticos, 333, 392
  de aptitud, 190
Enzimas de restricción (ER), 478, 502, 507
Enzimopatías, 526
Eosina Y, 53-457
Eosina-5-maleimida (EMA), 182
Eosinofilia, 522
Eosinófilos, 15-16, 30, 53, 60, *90*, 94, 526
Equinocito, 79
Equinocitosis, 82-3
Equipo Quantase, 190

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Equipos de inmunoanálisis enzimáticos, 126
Eritroblastos, *87, 87*
Eritroblastosis, 71, 86
Eritrocitos, 60, 72, 77, 94, *272*
  actividad de la G6PD, 195
  alteraciones, 526
  amplitud de la distribución (ADE), 14, 41
  análisis de la piruvatocinasa, 162
  anticuerpos frente a, 428
  aspecto, *582*
  componentes, 16-7
  concentrado, *451*
  cuerpos de Heinz, 270
  defectos citoesqueléticos, 182
  densidad, 14
  diámetro, 14
  elución de los anticuerpos, 217
  estudios de supervivencia, 305
  fragmentación. Vease *Esquistocitosis*
  fragmentos, 80
  inclusiones, 84, 263
  índices, 6, 30, 40
  macrocíticos, 140
  metabolismo, 186
  métodos del folato, 150-2
  microfotografía, *251*
  morfología, 163, 602
  normales recubiertos de penicilina, 221
  nucleados (EN), 32, *75*, *84*
  protoporfirina (PE), 129, 133
  reactivos, 427, 453
  rutas glucolíticas, *187*
  selección y transfusión, 460-1
  suspensiones, 426
  tipo HPN, 228
  vida media, 14
  volumen (VE), 309-13
Eritrocitosis, 522
Eritrofagocitosis, *59, 90*
Eritropoyesis, 71-5, 86, 101, 128, 133
Eritropoyetina, 517-8
Erizo de mar, 81-2
Errores
  debidos a la casualidad, 38
  del observador, 131
  en los recuentos celulares manuales, 580
  fuentes, 104-5,
  potenciales, 155, 464
  señales, *340-1*
  sistemáticos en los análisis, 539
  técnicos, 336
Escala
  aritmética, *12*
  geométrica, *12*
  lineal, *12*
  logarítmica, *12*
Escherichia coli, 342
Esferas crenadas, 76
Esferocitos, 71, 76, 79
Esferocitosis, 29, 71, 76-77, 526
  hereditaria (EH), 77, 88, 177, 179-180, 182, 186, 272
Esfero-equinocitos, 76-7, *77*
Esfigmomanómetro, 357
Especificidad, 539
  Kidd, 426
Espectrina, 182
Espectro de luz visible, *167*
Espectrofotometría, 170-1
Espectrofotómetro, 24, 122
Espectrometría, 168
  de masas-cromatografía en fase gaseosa (EM-CG), 139
  directa, 27
Espectrómetro, 24, 179, 197, 307, *308*
Espectroscopia de la absorción, 171
Espinas ilíacas, 100, 108
Espiroquetas, 60
Esplenectomía, 78, *82*, 54, 163, 270
Esplenomegalia, 62
Esquema
  de evaluación externa de la calidad nacional (NEQAS), 127, 242
  para la valoración de la calidad externa en Gales (WEQAS), 127
Esquistocitos, 70, 80-1
Esquistocitosis, 71, 73-80-1
Esquizonte, *62*
ESRChex, 513
Estado de los metabolitos, 139
Estándar(es)
  cero (δA0), 123
  de referencia, 591-2
  internacionales de práctica, 549
Estandarización, 561
Esterasa no específica (ENE), 281
Esterasas, 279-80
Estercobilina,
Esternón, 99
  punción, 100
Estibofén, 221
Estimaciones de la carga viral del plasma con VIH, 575
Estomatocitos, 79
Estomatocitosis, *73*, 83
  hereditaria (EsH), 83, 182, 186
Estreptocinasa 409
Estudios
  Doppler, 466
  NEQAS, 402
Etanol, 100, 169
Etiquetado aleatorio, 315
European
  Community Bureau of Reference (BCR), 25
  Cooperation for Accreditation of Laboratories (EAL), 548
  Union Bureau of Reference (BCR), 400
Evaluación morfológica, 575
Exactitud, 538, 563
  y comparabilidad, 541
Excreción urinaria, 155
Exploración con tomografía computarizada (TC), 319
Expresión de CD38, 300
Extensión(es)
  de la capa de leucocitos, 29, 59, 59-60
  de la médula ósea
    microfotografías, *140-1*
    preparación, 51
    tinción, 63-5
  de sangre
    dimórfica, *75*
    examen, 57-8
      de parásitos, 60
    fijación con metanol, *56*
    leucoeritroblástica, 86
    métodos de tinción, 55-60
    microfotografía, *71-87*, *90-97*
    preparación, 4, 51-2
    realizadas en portaobjetos, *52*
  mal realizada, *31*

F

Factor(es)
  antinucleares (FAN), 517
  de Fletcher, 328
  de la forma, 39
  de restricción homólogo (HRF), 224
  de von Willebrand (vWF), 20, 326, 330, 416
    análisis
      de inmunoabsorción ligada a enzimas, 359
      de multímeros, 363
      inmunoturbidométrico, 360
    enfermedad, 346, 359, 369
    función, 359
    gel multímero, *366*
    patrones multiméricos, 367
    proteasa disociadora, 223
  Fitzgerald, 328
  Hageman, 328
  intrínseco (FI), 154
  plaquetario, 14
  V Leiden (FVL), 378-3, 389, 481, 485
  VIII:C concentración, 359
Falciformación de los eritrocitos, 58
Fallo hepático, *82*
Favismo, 78
FCSC (cuentas de Quantum), 291-2
Fe^{2+} (hierro ferroso), 114
Fe^{3+} (hierro férrico), 114, 122
Fenacetina, *78*, 221
Fenotipo
  de McLeod, 81, 420
  Inab, 228
Ferritina, 114-6, *116*
  de las células HeLa, 122
Ferrocianuro, 115
  potásico, 25, 172
Ferrocinética, 314-5
Fiabilidad de las pruebas, 538
Fibrinógeno plasmático, 14, 410
Fibrinólisis, 390, 409
Ficoeritrina (PE), 288
Ficoll, 59
Fiebre, 62
Fijación
  al colorante, 182
  en gel, 365
Filariasis, 66
Fitohemaglutinina (PHA), 486
Flebotomía
  bandeja, 1-3
  procedimiento, 2-3
Flebotomistas, 1, 2, 3, 4
Flujo de barrido, 38

Fluorescencia, 152
de la hibridación in situ (FISH), 300, 488-489, 489, 528
microscopia, 61
Fluoróforo, 153
Fluoruro sódico (NaF), 279
FOE. Véase *Mediana de la fragilidad osmótica eritrocítica*
Folato eritrocitario, 14
Food and Drug Administration, 127
Formaldehído, 41
Formazán, 187
Fosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina (FAAFA), 293
Fosfato de potasio, 119
Fosfoenolpiruvato (PEP), 195
Fosfofructocinasa, *187*
Fosfoglicerato
cinasa (PGK), *187*, 198
mutasa (PGM), 198
Fosfogluconato deshidrogenasa, *187*
Fotodiodo, 37
Fotómetro, 27
Fotomultiplicador, 37
Fotones, 149
Fracción de reticulocitos inmaduros (FRI), 46
Fragilidad osmótica, 6
al incubar la sangre, 179-81
curvas, *179-81*
en el estado de salud, 180
en las anemias hemolíticas, 182
métodos de registro alternativos, 180-1
prueba, 582
Fragmentación, 70-1, 379-80
FRI. Véase *Fracción de reticulocitos inmaduros*

G
Gametocito, *63*
Ganglio linfático, 528
Gen
BCL-1, 489
BCL-2, 489
de fusión
BCR-ABL, *490*, *492*
FIP1L1-PDGFRA, 533
FUT1 (H), 415-6
FUT2 (Se), 415-6
TCR gamma, 495-6
Genes codificadores
ABO, 415-7
Duffy, 420
Kidd, 420,
Lewis, 418
MNS, 420
GeneScan, 495
Genética molecular de los antígenos plaquetarios humanos (HPA), 434
Genetically Modified Organisms Regulations (2000), 554
GEN-S, contador automatizado de sangre completa, 42
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Ga3PD), *187*, 199
Glicerol, 119
prueba de la lisis, 162
tiempo de lisis (GLT), 183
Glicina, 169
Global System of Mobile (GSM), 583
Globulina de unión a hormonas sexuales (GLHS), 386
Glucoforina
A (GPA), 420
B (GPB), 420
Glucosa-6-fosfato (G6P), 187
Glucosafosfato isomerasa, *187*
Glucosilfosfatidilinositol (GPI), 227
Glutatión
oxidado (GSSG), 187
peroxidasa, 78
prueba de estabilidad, 163, 197
reductasa, *187*
Goma de acacia, 59
Goncalves, P. , Dr. , 502
GPI (glucofosfoinositol), 326
Grado de hipoxemia, 18
Gráfico
de control, 566-7, *567*
de Levey-Jennings, 567
de Youden (xy), *570*, 570
hematológico, *542*
Granulación tóxica, 53, 90, *90*
Granulocitos, 42, 434-44
Gránulos azurófilos, *95*
Grifo seco, 100
Grupo
Europeo de Clasificación Inmunológica de las leucemias (EGIL), 302
FAB (Francés-Americano-Británico), 89
Grupos de genes de la globina, 234
Guía ISO/IEC 43, 549
Guidelines for Blood Transfusion Services, 425

H
Haptocorrina, 140
Haptoglobinas, 20, 116, 164-7
Hb. Véase *Concentración de hemoglobina*
A, posición, *255*
A_2, 15, 237
C, posición, 254
Constant Spring, 483
F, 15
heterocigota D-Punjab, *74*
Köln, 77, 236, 270
M, 236
S, posición, 254
St Mary's, 77, *78*
HbCO. Véase *Carboxihemoglobina*
HCM. Véase *Hemoglobina corpuscular media*
Health Service Circulars, 450
HELLP (hemólisis + elevación de enzimas hepáticas + bajo recuento plaquetario), 526
Hematíes, crenación, *7*
Hematocrito (Hto), 4, 14, 15, 16, 20, 28, 30, 39-40, 184, 185, 309, 513, 563, 578
centrifugado, 29
Hematología, laboratorios con pocos recursos
dirección del laboratorio, 583-4
disponibilidad de las pruebas, 574-5
mantenimiento
de la calidad de las pruebas, 576-7
de la fiabilidad de las pruebas, 576-7
organización de los servicios de laboratorio clínico, 574
pruebas hematológicas
básicas, 577-82
esenciales, 575-6
recuentos de linfocitos T CD4+, 582
tipos de laboratorios, 573
unidades de peso y medida, 592
Hematólogo, 62
Hematoxilina, 109
y eosina (H&E), tinción con, 109
Hemofagocitosis, 59
Hemofilia
A, 375
B, 375
Hemoglobina, *81-2*
A_2, 575
C, 205
cristales, 78, 84
enfermedad, 79, 84, 83-5
homocigosidad, *78, 79,*
con afinidad alterada para el oxígeno, 236
corpuscular media (HCM), 14, 16, 18, 20, 30, 162, 181, 237, 523, 568
cuantificación de la Hb
A_2, 255-259
F, 259-61
de las células falciformes, 251
del adulto (Hb A), 201
detección
de la afinidad alterada, 254
de la Hb MS, 253
de laboratorio, 240-50
heterocigosidad, 77
homocigosidad, 77, *78-9*
neonatal, 252
evaluación de la distribución intracelular de la Hb F, 261-2
fetal (Hb F), 234, *273*
inestable, 236
interpretación de los valores de la Hb A_2, 259
investigación de pacientes, 239-40
molécula, 233
pruebas para la Hb S, 251-2
S, homocigosidad, *84*
síndromes talasémicos, 236-9
síntesis, 73
tetrámero, 236
variantes estructurales, 234-6
Hemoglobinización, 76
Hemoglobinometría, 24, 577
Hemoglobinómetros, DHT, 28
portátiles de lectura directa, 27-8
Hemoglobinopatías, 263, 521, 526
Hemoglobinuria
de la marcha, 18
paroxística
nocturna (HPN), 171, 223-8, 276, 318, 384
por frío (HPF), 206
Hemograma completo, 24, 380
Hemólisis, 3, *81*, 140, 162
extravascular, 221

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Hemólisis *(cont.)*
inducida por fármacos, *89*
Hemopexina, 116, 167
Hemosiderina, 114-6, *116*, 168
Hemosiderinuria, 223
importancia, 168
HemoTec Automated Coagulation Timer, 406
Hemox-Analyzer, 200
Heparina, 2-3, 5-6
análisis del anti-Xa, 406
cofactor II, 14, 389
de bajo peso molecular (HBPM), 404
no fraccionada (HNF), 404
respuesta al TTPA, 405
tratamiento, 403-9
trombocitopenia y trombosis inducidas por, (TTIH), 407
Hepatitis
B, 310, 313
C, 310, 313
Hepatoma fibrolamelar, 156
Hepatomegalia, 62
Hepatopatía, 73-74, 140
alcohólica, *82*
Hexocinasa, *187*
Hibridación con oligonucleótidos aleloespecíficos, 481
Hidroclorotiazida, 221
Hidrops fetal con Hb de Bart, 238
Hidroxicarbamida, 72, 84, 92, 141, 523, 524
Hidroxiurea, 72
Hierro
absorción a nivel molecular, 114
almacenamiento, 115
anemia por déficit de, *116*
biopsia tisular, 118
captación y liberación, 115
déficit, 106, 128, 132
elementos respondedores al, (IRE), 115
estado, 118-9
estándar, 122
intercambio en el organismo, *114*
quelantes, 122
radioactivo (^{59}Fe), 313, 315
repleción, 124
sérico, 122
sobrecarga, 121, 128
terapia con, 131
tinción, 268
trastornos del metabolismo, 116, 117
utilización, *314*, 314
Hipercromasia, 75
Hipercromía, 75
Hiperesplenismo, 523
Hiperglucemia, 40
Hipersegmentación, 92
Hipocromasia, 71, 74
Hipocromía, 74-*5*, 74, 75
Hipoesplenismo, *97*
Hipotiroidismo, 140
Histocompatibilidad cruzada, 461-3
Histograma, frecuencia, 12, *12*, 43, *545*
Holotranscobalamina (HoloTC), 140, 146, 156
Homocigosidad para la hemoglobina S, 84
Homocisteína, 152
Homogeneidad de la muestra, 8
Hospital Transfusion Committees and Teams, 450
Hto. Véase *Hematocrito*

I
IATA, instrucciones de embalaje, 556, 559
ICSH. Véase *International Council for Standardization in Haematology*
Ictericia, 223
Identificación de anticuerpos, 457-9
Ilford 625, 25-7
Iluminación
de Nomarski, 58
interferencial, 57
Imágenes, 307
por radionucleidos, 163
diversas, 320
Immunofenotipificación, 6, 59, 522
análisis, 100
introducción a, 287
métodos de estudio de los marcadores inmunológicos, 288-302
Immunoglobulina
G (IgG), 117, 150, 207
M (IgM), 417
Immunoperoxidasa (IP), 302
Importancia de los detalles clínicos, 141-2
Inactivación del cromosoma X (ICX), 194, 375
Incertidumbre de la medición, 538
Inclusión en metacrilato, *109*
Inclusiones de cadenas, 263
Incompatibilidad ABO
mayor, 471
y menor, 471
menor, 471
Incubadora, 5
Índice
de actividad media de la peroxidasa (MPXI), 43
de desviación, 569
de la transferrina, 126
de masa corporal magra (IMM), *312*, 312
de variación, 541
Indio (^{111}In), 309
Indometacina, 221
Infarto agudo de miocardio, 511
Infección
por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), 62, 310, 523, 555, 564, 573
por VLTH-I (virus linfotrópico de células T humano tipo I), 96
vírica, *95*
Inhibidor
de la fibrinólisis activado por trombina (TAFI), 331
de la vía del factor tisular (TFPI), 326
Inmadurez, 71
Inmovilización con anticuerpos monoclonales de los antígenos
de granulocitos (MAIGA), 438
plaquetarios (MAIPA), 434, 443
Inmunocitoquímica, 293
Inmunocromatografía, 519
INRatiometro, 339
Institute for
Biomedical Science, 536
Reference Materials and Measurements (IRMM), 39, 562, 592
Instrumentación, 540-1
Instrumentos automatizados, 39, 43-4
Interleucina-6, 424
International
Air Transport Association (IATA), 559
Council for Standardization in Haematology (ICSH), 2, 6, 15, 25, 29-30, 39, 45, 55, 122, 177, 273, 310, 311, 427, 511, 540, 562
Electrotechnical Commission (IEC), 553
Laboratory Accreditation Co-operative (ILAC), 549
Normalized Ratios (INR), 342, 400, 590
Organization for Standardization (ISO), 1, 549, 553, 562
Sensitivity Index (ISI), 342, 400, 590
Intervalos de referencia, 11-13, *12*, 127-8, 156
Intoxicación
por clorato sódico, *77*
por plomo, 74
Inulina, 223
Investigación
de la hemostasia, 332-4
afibrinogenemia, 356-57
anticoagulantes circulantes, 354-56
coagulación intravascular diseminada (CID), 373-5
componentes de la hemostasia normal, 326-32
defectos de la hemostasia primaria, 357-59
déficit de factores de la coagulación, 349-54
congénito, 375, 375
disfibrinogenemia, 356-57
enfermedad de von Willebrand, 359-72
estudio básico de la coagulación, 342-345
exploraciones de segunda línea, 345-9
hipofibrinogenemia, 356-57
notas del equipo, 334-35
prueba de la solubilidad del coágulo para el factor XIII, 372-3
pruebas de primera línea, 345
variables preanalíticas, 335-42
del control de calidad para el anticuerpo del factor intrínseco de la UKNEQAS, 153-4
del fenotipo, 375
hematológica, 473
serológica, 468, 473
Inyección de adrenalina, 19
IRMM. Véase *Institute for Reference Materials and Measurements*
IRP1, 115
IRP2, 115
ISO. Véase *International Organization for Standardization*
Isoanticuerpos, 434
Isoelectroenfoque (IEF), 240, 247, *248-49*

Isopropanol, 2-4
  prueba de estabilidad, 253
Isotiocianato de fluoresceína (FITC), 288,
Isoton, 290
  II, 227
Isótopos radioactivos en hematología, 305-308
  ferrocinética, 313-5
  fuentes, 305
  medición
    de la vida media plaquetaria, 321
    de las pérdidas sanguíneas, 320-1
  pruebas de compatibilidad, 319
  visualización del bazo, 319, 20
  volumen sanguíneo, 309-13

J
Jeringas, 1, 106
  de plástico desechables, 2
Joint Working Group on Quality Assurance, 546

K
K_2-EDTA, 28
Kernicterus, 168
Kininógeno de alto peso molecular (HMWK), 328

L
Lactato deshidrogenasa (LDH), *187*, 528
Lactobacillus casei, 150
Lactoferrina, 6
β-lactoglobulina, 150
Lancetas, 1, 1-4
Lauril sulfato, 26
  sódico, 24, 37
Lavado con gel, 365
L-cisteína, 228
L-dopa, 221
Leishmaniae, 60
Leishmaniasis, 61-2, *65*, 523
Leptocitosis, 82, *82*
LES. Véase *Lupus eritematoso sistémico*
Leucemia, 41-284, 522
  aguda, 528
    bifenotípica, 297
    de linfocitos T, *277*
  de células peludas, *278*
  de linfocitos T, 96
    grandes granulares (LGG), 300
  granulocítica crónica, *93*, 94
  linfoblástica aguda (LLA), 93, 95, 96, 275, 291-92, 486, 533
    Philadelphia positiva, *96*
  linfoma de linfocitos T del adulto (LLTA), 301
  megacarioblástica aguda, 297
  mieloblástica, *109*
  mieloide, 102
    aguda (LMA), 92, 269, 273, 291, 523
    crónica (LMC), 84, 95, 273, 480, 490, 528
      atípica, 95
  mielomonocítica
    aguda, *283*
    crónica, 94
  monocítica aguda, 281
  prolinfocítica, 95-96
    de células B (LPL-B), 298
    de linfocitos T (LPL-T), 301
Leucoaglutinación, 6, 90
Leucocitos. Véase *Recuento de leucocitos totales*
  aglutinación, 41
  agregados, 6
  imágenes, 320
  preparación de una extensión sanguínea húmeda, 57
  recuento, 4, 18-9, 30, 94
Leucocitosis, 522
Leucopenia, 525
Leucopoyesis, 101
Levodopa, 146
Lieberkuhn, criptas de, 115
Límites
  de confianza, 12
  de referencia, 11
Linealidad, 540
Líneas Lilley, 466
Linfadenopatía, 62, 528
Linfoblastos, 95
Linfocitos 67, *7*, 15-16, 19, 42, 60, *94*, 94-96, 525
  B, 93
  en la leucemia linfocítica crónica (LLC), 95, *95*, *291*, *299*
  granulares, *95*
  lobulados, 96
  plasmocitoides, 95
  recuento, 20
  subtipos, 14, 15-16
  T, 93
Linfocitosis, 522
Linfoma
  de Burkitt, 486
  de las células del manto (LCM), 298
Linfomas, 99, 106, 522
  no hodgkinianos, 296
Lipidemia, 148
Lipopolisacárido, 6
Lipoproteína
  (a) (Lp[a]), 380
  de alta densidad (HDL), 380
  de baja densidad (LDL), 380
  de densidad intermedia (IDL), 341
  de muy baja densidad (VLDL), 341
Lisado, 27
Lisis, 5, 167, 178, 183, 211, 219, 391, 424-5
  de la placa de fibrina, 390, 391
  demostración, 428
  por anticuerpos fríos, 223
  pruebas, 428
Litio, 6
LLA de linfocitos B maduros (LLA L3), 296
Loa loa, 65
Loiasis, 65
Lovibond Comparator, 169
Lumi-Phos, 150
Lumoagregómetro, 372
Lupus eritematoso sistémico (LES), 59, *80*, 517
Lyphochek, 123

M
Macrocitos, 72-3
  hipocrómicos, 41
  ovales, 72
  policromáticos, *75*, *77*, *79*
Macrocitosis, 72-3, *73*, 524, 526
Macroestomatocitos, *79*
Macrófagos, 106
Macroovalocitos, 72, *79*
Maduración de las células mieloides, 106
Mancha en el tiempo cero, 188
Mapa de la placa para la determinación de la UIBC, 125
Marcado de cohorte, 316
Marcador
  de linfocitos B, 289
  mieloide, 297
Marcapasos, 554
Masa
  eritrocitaria, 20
  molecular relativa (MMR), 25, 330
Material estándar, 561
Media
  aritmética (χ), 11, 124
  logarítmica del TP normal (LMNPT), 342
Mediana de la fragilidad
  corpuscular (FOE), 180
  osmótica eritrocítica (FOE), 14
Medias de distribución aleatoria, 31
Medical Devices Agency, 36, 121, 126, 540
Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency (MHRA), 334, 562
Medición del factor VIII, *356*
Medio
  de resolución de mono y polinucleares (MPRM), 440
  salino
    de baja fuerza iónica (LISS), 424, 426, 454
    de fuerza iónica normal (NISS), 217, 426, 458
  separador de linfocitos (LSM), 440
Médula ósea
  agujas
    de punción, 101-2, *102*
    desechables, *102*
  alteraciones de todas las líneas celulares, 526
  aspiración, 100-103, 106
  aspirada, examen, 103-5
  biopsia, 99-111, 108
    por trepanación, 106, 108
  compensación de la anemia, 71
  complicaciones, 108
  en la leucemia mieloide aguda, *274*
  espacio, 108
  esquema de examen sistemático, 105-6
  examen de la trepanación, 575
  extensión, 57, *103*, *105*
  fallo, 240
  frotis, 275
  informe de ejemplo, *107*
  intervalos de normalidad en los recuentos diferenciales, 104
  macrófagos, 62
  microfotografía, *109-11*

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Médula ósea *(cont.)*
necrosis, 106
parásitos, 53
partículas, *270*
población de linfocitos B, 289
progenitores eritroides, 17
recuentos
celulares cuantitativos, 103-4
diferenciales, 103
suministro de hierro, 118, 127
tinción con violeta de metilo, 271
trépano
Islam, *102*
Jamshidi, *108*
Megacariocitos, 59
Megaloblastos, 59, 87, 72, *140*
Memoria de acceso aleatorio (RAM), 542
Menstruación, 117
2-mercaptoetanol (2-ME), 220
Mesurando, 538
Metahemalbúmina, 166-8
Metahemoglobina (Hi), 15, 24, 163, 171, 189, 253, 272
Metahemoglobinemia, 174, 222
Metamielocitos, 32, 59, *93*
Metanol, 55-6, 100
Metilcelulosa, 59
α-metildopa, 221
Metilenetetrahidrofolato, 146
Metilmalonil-CoA, 152
Metiltetrahidrofolato (MTHF), 141
Metionina, 152
Método
aparte del consenso, 570
cuantitativo de la capa de leucocitos (QBC), 61, 65
de concentración en el tubo capilar, *65*
de detección del porcentaje, *339*
de inmunodifusión radial (IDR), 165-166
de Ivy, 358
de Jonxis y Visser, 260-1
de la cianmetahemoglobina, 24
de la elución ácida, *272*
de la hematina
ácida de Sahli, 24
alcalina, 24
de la impregnación argéntica, 109, *111*
de la oxihemoglobina (HbO_2), 24, 26-7, 163, 190
de la papaína en dos tiempos, 427
de la placa de microtitulación, 120, 122
de los límites del acuerdo, 541
de Low, 427
de Perls, 103
de química húmeda, 169
de referencia, 562
de Romanowsky, 90
de tasa, 339, *339*
de tinción
con Azur B-eosina Y, 53-4, 61
de Jenner-Giemsa, 53, 56
de May-Grünwald-Giemsa, 54-5, 61, 69, 109, 109, 140-1, 275, 280
rápida, 57
de Field, 57, 70
del microhematocrito, 28-9
multimérico no radiactivo, 363
operativo, 562
QBC. Véase *Método cuantitativo de la capa de leucocitos*
recomendado, 562
seleccionado, 561
Métodos
automatizados, 124-6
de demostración de los anticuerpos, 439
Metosulfato de fenazina, 187
Metotrexato, 147
Metrizoato de sodio, 59
Microangiopático, *81*
Microcitos, 73
hipocrómicos, *75*
Microcitosis, 40, 73, 74, *73-5*, 75, *75*
Microfilaria, 60, 61, *64*
Micropartículas de látex, 333, 360
Micropipeta, 29
Microscopia electrónica de barrido, 58, 79, *88-9*
Microscopio, 600-1
mantenimiento de rutina, 601-2
Microsferocitos, *80-1*
Microsoft
Excel, 123
Picture It, 363, 365
Microtainer, 4
Mieloblastos, 60, *93*
Mielocitos, 32, 60, *93*
Mielodisplasia, 528
Mielofibrosis, 108-109, 223
colágena, *111*
idiopática, *72*, *87*, 523, 528
secundaria, 2
Mieloma múltiple, 523
Mielomatosis, 86, 527
Mieloperoxidasa (MPO), 273-74, *274*
tinción, 273
Migración electroforética, 195
Minitab, 123
Mioglobina, 174
Moda, 11, 12
Molécula de cadena única (scu-PA), 331
Moléculas de fluorocromo soluble equivalente (MFSE), 291
Monitorización consecutiva, 570
Monocitopenia, 526
Monocitos, *8*, 16, 19, 42, 60, *94*
activación, 6
recuento, 20
Monocitosis, 140, 522
Monómero, 25
Mononucleosis infecciosa (MI), *95*, 515-7
Monotioglicerol (MTG), 150
Monóxido de carbono, 174
Morfología, 522
celular, 5, 521
de la célula sanguínea
anomalías de los hematíes, 82-6
basófilos, *93*
células espiculadas, 79-82
daño a los eritrocitos, 75-79
efectos
de la esplenectomía, 87
del almacenamiento, *6*, 6-7
del hipoesplenismo, 87
eosinófilos, 93
eritrocitos irregularmente contraídos, 77-78
eritropoyesis anómala, 71-5
examen de las extensiones sanguíneas, 70
formación inadecuada de hemoglobina, 74-5
microscopia electrónica de barrido, 87-8
morfología
de los eritrocitos, 70-2
de los leucocitos, 87, 90
plaquetaria, 96-97
neutrófilos polimorfonucleares, *90*, 90-3
MPXI. Véase *Índice de actividad media de la peroxidasa*
Muestra urinaria en el momento medio de la micción (MUMM), *380*
Muestras de sangre
capilar por punción cutánea, 1
descongelación, 336
fetales, 464
manipulación, 338
Multinuclearidad eritroide hereditaria asociada con una prueba de suero acidificado positiva (HEMPAS), 225
Mutación mediterránea de la G6PD, 497
Mutaciones en la región no traducida (UTR), 481
Mycoplasma pneumoniae, 206

N

NADPH-metahemoglobina reductasa, 187
α-naftil
acetato esterasa (ANAE), 279, 282
butirato esterasa, 279, 281
Naftol AS-D cloroacetato esterasa, 280-3
National
Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 5, 335, 562
Health Services Medical Devices Agency, 334
Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), 151, 425, 591
Measurement Accreditation Service (NAMAS), 548
Pathology Accreditation Advisory Council (NPAAC), 548
Physical Laboratory, 27
NCCLS. Véase *National Committee for Clinical Laboratory Standards*
Nefelometría, 164, 339
Negro Sudán B (SNB), *274*, 275-2
Neoplasias mieloides, 523
NEQAS (Esquema de evaluación externa de la calidad nacional), 561
Neutrofilia, 522
Neutrófilos, 6, 15-16, 60, *73*, *90-2*, 93, *94*, 140-1
apoptósicos, 8
coeficiente de linfocitos, 16, 19
hipersegmentados, 92
hipogranulares, *91*
hipolobulados, *93*
picnóticos (apoptosis), 93

Neutrófilos *(cont.)*
polimorfonucleares, *7*, 30, *90*
recuento, 20
Neutropenia, 526, 528
Nicotina adenina dinucleótido fosfato (NADPH), *187*, 187
No transferrina, 116
No trombogenicidad, 328
Nomenclatura de Fisher, 418
Nomifensina, 221
Nonidet P40, 25
Norma(s)
europea (EN 14820), 2
europeas (EN) sobre prácticas de laboratorio médico, 549
para el control de sustancias peligrosas para la salud (COSHH) (2002), 554
sobre radiaciones ionizantes (2000), 554
Normoblastos, 87, *140*
Núcleos, 91, 94-6
Nuevo azul de metileno, 34-5, *33*, 32, 45, 271

O
Ocular de Miller, *35*
OptiMAL, 519
Ordenadores del laboratorios, 542-3
Organización Mundial de la Salud (OMS), 269, 337, 400, 542, 553, 575, 577
categorías de enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas, 532
clasificación, 90, 296, 532
de la leucemia mieloide aguda (LMA), 530
de los síndromes mielodisplásicos (SMD), 531
International Laboratory for Biological Standards, 562, 591
norma internacional, 25, 120
preparación de tromboplatina de referencia internacional, 590
revisión global de OMS/WFH, 376
Organización/dirección del laboratorio
acreditación, 547-9
auditoría del laboratorio, 547-9
comparativa, 550
estándares internacionales de práctica, 549
estructura y función de la dirección, 535, 8
fiabilidad de las pruebas, 538
instrumentación, 540-1
procesamiento de datos, 541-3
selección de las pruebas, 539-40
Orion, equipo de inmunoanálisis enzimático, 127-8
Oscilógrafo, 37
Osmolalidad, 38
Ovalocitos, 72, *87*
Ovalocitosis, 78-9
del sudeste asiático (OSA), *79*, 83, 182, 186
Oxazine 750, recuento de reticulocitos con, 45
Óxido nítrico (NO), 326

P
P. falciparum, 62, *63*
P. malariae, 62, 63, 519
P. ovale, 62, *63*, 519
P. vivax, 62, *63*, 519
Pancitopenia, 62, 526
Panel de anticuerpos monoclonales, 298
Papel de gráfico semilogarítmico, 12
Par de bases (pb), 507
Parásitos del paludismo, 61
Patrón oro, 131
para el diagnóstico, 65
prueba, 407
PCR-CL, 341
p-dimetilaminobenzaldehído, 170
Pelger-Huët
anomalía, 92
células, 92, 526
Penicilina, 221-2
Perfiles de coágulos, 340, *341*
Periodo de semivida, 155, 305, 308, 390
Peroxidasa de rábano, 119, 119, 120
Peróxido de hidrógeno, 119, 163
Persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal (PHHF), 234
Peso molecular monomérico de la hemoglobina, 27
Pesos atómicos, 593
6PG deshidrogenasa (6PGD), 187
pH, 25, 34, 38, 56, 58, 82, 109, 119-20, 149, 167, *243-5*, 424
en la lisis, *22*
Picnocitos, 70
Picnocitosis, 78
infantil, 78, *79*
Picnosis nuclear, 105
Pilas de monedas, autoaglutinación, 85-6
Pipeta Pasteur, 5, 34
Pipetas (mecánicas) automatizadas, 595, 600
Piropoiquilocitosis hereditaria (PPH), *79*, 186
Placa de tórax (PT), 380
Plan de valoración externa de la calidad (EQAS), 570
Plaquetario satelitismo, *97*
Plaquetas, 327-8, 434-44, 527
agranulares, 97
agregación, 366-72, *371*
agregados, 6
amplitud de la distribución (ADP), 45, 140
anisocitosis, 45, *97*
gigantes, 97, *97*
glucoproteína (GP), 434
plasma
pobre en (PPP), 336, 357
rico en (PRP), 370, 383, 408
preparación, 440
prueba de inmunofluorescencia, 437, *441*
recuento, 4, 6 14, 19, 32, 44, 45, 97, 163, 345, 404, 575, 580-1
reticuladas, 45
separación de eritrocitos, 59-60
supervivencia en la enfermedad, 321
Plaquetocrito, 45
Plasma
aclaramiento del hierro, 313, *314*
almacenamiento, 336, 426
AMM sérico, 152
atrapamiento, 29, 40
diferencias entre suero y plasma, 5
ferritina, 122
glucoproteína, 116
hematíes libres, 5
hemoglobina (Hb), 14, 161
homocisteína, 146
transporte del hierro, 115
viscosidad, 14, 20, 515
volumen, 19, 310-1
Plasmina, 331
Plasmodia, 60
Plasmodium falciparum, 60, 61, 518, 575
Población
caucásica, 417
de hematíes dimórficos, 74
de referencia, 11
doble, 318
curva, 318
normal, 12
Poiquilocitos, 71-2, *75*, 83, *89*
con cola, 72
de células falciformes (SC), *83*, 84, *84*
en lágrima, 72, *75*, *87*
Poiquilocitosis, 58, 71, *72-5*, 75
Policitemia, 18, 171, 522
Policromasia, 71, 86
Polietilenglicol (PEG), 387, 430
Polimorfismo
de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), 264
genético C677T, 146, 154
Política
de Clinical Laboratories Improvement Amendments (CLIA 1988), 548
de seguridad por departamentos, 553
Ponceau, 249
Porcentaje acumulado, 546
Porfiria, 171
eritropoyética, *74*
congénita, 171
Porfirinas, 170-1
Porfirinuria, 171
Porfobilinógeno, 169-70
Postesplenectomía, *85*, *89*
Postransfusión, *77*
Potasio, 115
dihidrógeno fosfato (KH_2PO_4), 25, 26, 57
Potencial de trombina endógena (PTE), 395
PPZ. Véase *Protoporfirina de zinc*
Precauciones biopeligrosas
especímenes, 555-59
recogida y manipulación de la sangre, 1
Precisión, 538, 540, 561
Precursor de Kell (Kx), 81
Preparación(es)
de los sueros de prueba, 120
de referencia, 561-63
del hemolizado, 150
del material de cristal, 592
húmedas, 64
Presión parcial de oxígeno (pO_2), 198, 200
Principio de transferencia energética de fluorescencia por resonancia (FRET), 491

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Procedimiento(s)
estadísticos, 11-12, 594-5
normalizados de trabajo (PNT), 549, 553
posflebotomía, 3
Procesamiento de datos, 541-2
Productos de degradación de la fibrina/fibrinógeno (PDF), 344, 405
Program for Appropriate Technology for Health (PATH), 519
Programa de mejora del laboratorio, 550
Proliferación de fibroblastos, 111
Prolinfocitos, *96*
Protección de la radiación, 305-9
Proteína
2 rica en histidina (HRP-2), 186, 518
C (PC), 14, 380
activada (PCA), 389
análisis, 385-90
antígeno, 386
resistencia, 388-389
reactiva (PCR), 131-2, 341, 511, 591
de Kell, 420
de unión del C4b (C4bBP), 387
fijadora del folato (PFF), 150
P53, 300
promielocítica (PML), 296
reguladora
S (PS), 14, 20
análisis, 386
déficit, 385
Protoporfirina, 171
de zinc (PPZ), 129, 171
Protrombina y proconvertina (P&P), 399
Prueba(s)
a la cabecera del paciente, 545
básicas de coagulación, 574, 575
citoquímica, 194
Clearview, 517
cruzadas serológicas, 452
cualitativas, 571
de aglutinación de granulocitos (GAT), 438
de anticoagulante lúpico (LAC), 336, 380-4
de anticuerpo inmunofluorescente, 516
de antiglobulina, *90,* 429-1
directa (PAD), 162, 205, 208, 211, 429
indirecta (PAI), 208, 422, 430
de células de LE, 517
de Coombs, 211
de detección, 521
no invasivas, 28
de Donath-Landsteiner
anticuerpos, 209
directa, 219
especificidad, 220
indirecta, 219
en dos etapas, 221
intervalo térmico, 220
de cinc de Schlesinger, 169
de función renal, 163
de Ham, 163, 223, 226, 228
de inhibición de la tromboplastina diluida, 383
de inmunofluorescencia de granulocitos (GIFT), 438
de Kleihauer, 467
de lisis
en sucrosa, 163, 223, 224
en suero acidificado (prueba de Ham), 163, 223, 224-225, 528
de neutralización de la protamina, 407
de pirimidina-5'-nucleotidasa (P5'N), 74, 191-2
de polibreno directo, 213
de quimioluminiscencia de granulocitos (PQLG), 438
de respuesta en fase aguda, 511-516
de Schilling, 144, 155, 156, 305
de Schum, 162, 167
de solubilidad de la Hb S, 251, 273
de tiempo de lisis con glicerol acidificado (AGLT), 183
de un tubo, 582
de veneno de cobra, 223
en los centros de atención (POCT), 1, 26, 36, 403, 545-6
en placas, 428, *516*, 518
en tubo, 428
semicuantitativas, 571
sobre porta de *Clearview*, *517*
suplementarias para el paludismo, 518-90
Puercoespín, 81-2
Punción
cutánea, 3
en lactantes, *4*
del ilion, 100
Punteado basófilo, 70-71, *74*, 72-6, *74*, 255
Puntos de Schüffner, 53
Puntuación ID, 569
Púrpura
postransfusional (PPT), 435
trombocitopénica autoinmune postesplenectomía, *85*
trombótica trombocitopénica, 80

Q

QIFIKIT (Dako Cytomation), 292
Q-PCR
análisis, 505-6
Universal Master Mix, 492
QR-PCR, análisis, 493
Quantitative Clinical Chemistry, 200
Quantum Simply Cellular (QSC), 291-2
Quemaduras graves, *81*
Queratocitos, 79, 81, *81*
Quimioterapia, 46
Quinidina, 221
Quinina, 221

R

R&D, equipo de inmunoanálisis enzimático, 127-8
Radioinmunoanálisis HoloTC, 156
Ramco, equipo de inmunoanálisis enzimático, 127
Rango de celularidad, 104
Rasgo
de células falciformes, *482*
de la Hb C, 236, 240
talasémico β, 78
Ratio
mieloide:eritroide, 106
RsTf/$\log_{10}$ ferritina, 133
textarina/ecarina, 383
RE. Véase *Recuento eritrocitario*
Reacción(es)
al azul de Prusia (Perl), 268
antígeno-anticuerpo, 424
citoquímicas, 284-5
de la fosfatasa ácida, 276-7
de Perls, 73, 109, *168*, 267, *270*, 284
en cadena
de la polimerasa (PCR), 419, 478-81, 479, 482-3, 484, 497, 499-501, 507, 519, 575
cuantitativa en tiempo real (QR-PCR), 491, 493
transcriptasa reversa (TR-PCR), 480, *490*, 502-4
leucemoide, 92
transfusionales hemolíticas (RTH), 421
Reactivos, 590-1
de Bøyum, 59
de Ehrlich, 169
de Ellman, 196
de referencia, 591-2
DTNB, 197
Receptor
de la transferrina (RsTf), 115
del linfocito T (TCR), 289, 296, 480, 496
endotelial de la proteína C (PC), 326
Recién nacido
enfermedad hemolítica, 464-9
serología prenatal, 464-9
Recuento
absoluto de reticulocitos, 34
corporal total, 156
de basófilos, 30
de leucocitos, 6, 14, 15-16, 20, 521, 563
totales, 41
de reticulocitos, 45
con auramina O, 46
diferencial de leucocitos, 104, 521
método longitudinal, 31
en almenas, 31
eritrocitario (RE), 4, 14, 15-16, 20, 28, 37, 563
manual
de células, 28
del diferencial de leucocitos, 30-2
por impedancia, 37
sanguíneo
efectos del almacenamiento, 6
variaciones fisiológicas, 16-20
total de células nucleadas (TCN), 32
Redes neurales, 43
Referencia alternativa, método, 29-30
Región de Golgi, 274
Registros de mantenimiento, 541
Requisitos de CLIA '88, 548
Resistencia
a la aspirina, 409, 410
a la proteína C activada (APCR), 336, 379, 388
Resonancia magnética (RM), 319
Reticulina, 109
Retículo endoplásmico, 91
Reticulocitos, 15-16, 271
colorantes, 34

Reticulocitos *(cont.)*
de estrés, 34
estimulados, 34
fracción de reticulocitos inmaduros (FRI), 45
inclusiones eritrocíticas, 35
índice, 34
métodos de fluorescencia para el recuento, 35
microfotografías, *33*
porcentaje, 35
recuento, 6, 14, 32-36, 34-5, 45
Rifampicina, 221
Royal College of Pathologists, 536, 550

S
s-adenosil homocisteína (sAH), 153
Sal de sodio, 6, 221
Salicilazosulfapiridina, 221
Salino tamponado
con fosfato (PBS), 38, 182, 360, 453
con Tris (TBS), 125, 294
Sangre
anticoagulación, 51
capilar
concentración de hemoglobina (Hb), 4
diferencias con sangre venosa, 4
lisada, 65
recogida, 3-4
coagulación, 328-31
del cordón umbilical, 468
desfibrinada, 5, 602
muestras, 451
oculta en heces (SOH), 380
parásitos, 60, *64*
policitémica, 29, 34
recogida
de especímenes, 2
y manipulación, 1-8
red de coagulación, *328*
vaso, 326-7
venosa, 349
diferencias con la sangre capilar, 4
recogida, 1-3
viscosidad, 20
volumen, 14
Saturación de la transferrina, 14
SE-223 70, 43
Second National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES II), 130
Secuestro, *320*
Segmentos variables, diversos y de unión (VDJ), 494
Seguridad del laboratorio
diseño de las instalaciones, 554-5
documento de la política, 554
eliminación de residuos, 558
especímenes biopeligrosos, 555-58
transporte de las muestras, 558-559
Selección de las pruebas, 539-40
Sensibilidad, 539
Señalización, 43
Separación por doble densidad de linfocitos y de granulocitos, *440*
Septicemia, 106
Serie Sysmex SE, contador automatizado de sangre completa, 42
Serología prenatal, 464
Serpiente
Agkistrodon rhodostoma, 349
Bothrops atrox, 349
Sesgo, 539
Seudoaglutinación, 58
Seudopolicitemia, 522
Seudotrombocitopenia, 96
Sharp-X, 3
SHOT *(serious hazards of transfusion),* 547
Sida. Véase *Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida*
Sideroblastos, 267-73
Siderocitos, 267-73
Sifón de mercurio, 37
Significado clínico, 571
Síndrome
compartimental glúteo, 108
de Behçet, 392
de Bernard-Soulier (SB-S), 97, 369, 372, 527
de Chediak-Higashi, *91*
de la inmunodeficiencia adquirida (sida), 43, 515, 573
de la plaqueta gris, *97*, 97
de Lesch-Nyhan, 140
de Zieve, 222
hemolítico-urémico, 80
mielodisplásico (SMD), 72-3, 83, *91*, 92, 269, 273, 523, *524*, 529
Síntesis
de ADNc, 504
de cadenas, 234
del hemo, 169
Sistema
Abbott
3500 Cell-Dyn, 42
4000 Cell-Dyn, 43
Architect, 149
AxSYM, 121, 149
IMx, 121, 149-50-4
recuento, 37
Beckman Coulter Access, 121
Chiron ACS:180, 121
Colton, 421
de activación por contacto, 329
de grupos sanguíneos ABO, 414
de impedancia-abertura, 39
de Kell, 420
de Kidd (JK), 421
de mutación refractario a la amplificación (SMRA), *483*
de puntuación
para la leucemia linfocítica crónica (LLC), 298
para las leucemias agudas bifenotípicas, 297
de recuento, 37
Beckman-Coulter, 37
de Roche, 37
Sysmex, 37
de tránsito rápido, 545
de tubo al vacío, 2
DELFIA, 121
Dombrock, 421
fibrinolítico, 331
HemoCue, 28
Kx, 420
Nichols Advantage, 127
PFA-100, 358
Roche Elecsys 2010, 121, 149
Wallac Auto, 121
Welcan, 537
Yt (Cartwright), 421
Sitio de amplificación creado por enzimas de restricción (ACRES), 481, *485*
Sobrenadante rico en leucocitos (LRS), 440
Software del genotipificador (ABI), 497-8
Solución
ácido-citrato-dextrosa (ACD), 309, 563
conservante, 587-88
de Alsever, 5-6
de barbital sódico, 120
de bromelina, 427
de Hanks, 288, 291
de naranja de acridina, 35
de papaína (método de Low), 427
estándar de HiCN, 163
salina de azur B, 34, 54-5, 61
Sondas, *492*
Sondeo Q, 550
Southern blotting, 499, 507
Streptokinase haemolyticus, 409
Subtipos de LMA según la clasificación francesa-americana-británica (FAB), 297, 530, 532
Succinil coenzima A, 152, 169
Suero
ácido metilmalónico, 146
almacenaje, 426
análisis de la B_{12}, 148-50
bilirrubina, 168
concentraciones del receptor de la transferrina (RsTf), 127
diferencias con el plasma, 5
ferritina, 128
folato, 14
glucoproteína, 116
haptoglobina, 14
hierro, 14
mapa de la placa para la determinación de hierro, *123*
métodos del folato, 150
salino fisiológico, 36
tubos separadores, 5
vitamina B_{12}, 14
Sulfahemoglobina (SHb), 24, 163, 171
Sulfahemoglobinemia, 222
Sulfato
azul de Nilo, 189
de amonio, 100
de hemoglobina, 24
Sulfuro de hidrógeno, 172
Sysmex XE2100, 43

T
T. b. gambiense, 65
T. b. rhodesiense, 65
T. b. cruzi, 65
Tabaquismo, 18-20

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Talasemia, 29, 72, 74
evaluación del estado del hierro, 263
investigación de la sospecha, 254
β mayor, 72-5, 80-1, 85, 87, 89, 179, 252, 262, 271, 470, 483
métodos de investigación, 255
pruebas de laboratorio, 238
síndrome clínico, 236-7
variantes talasémicas estructurales, 238-9
Tamaños de los tubos, 592
Tampón, 588-90
de carbonato sódico, 119
de lisis de los eritrocitos (RCLB), 502
fosfato isoosmótico, 34, 58
HEPES (N-2-hidroxietil piperazina-N'-2-ácido etanosulfónico), 55, 61
Tris-ascorbato-hierro, 125
Tris-HCl/EDTA, 193
Tarjetas de anticuerpos, 460
TCN. Véase *Recuento total de células nucleadas*
Tecnecio (^{99m}Tc), 309-10
Técnica(s)
de adherencia de eritrocitos en fase sólida (SPRCA), 443
de denudado con cloroquina, 437-38
de recuentos sanguíneos automatizados, 24, 36-7, *44*
de sumergir y remojar, 57
hematológicas
amplitud de la distribución
de la hemoglobina, 41-2
eritrocítica (ADE), 41
concentración de la hemoglobina, 37
contadores
de células sanguíneas automatizados, calibración, 46
electrónicos, fiabilidad, 37-9
espectrometría directa, 27
gráficos de los instrumentos automatizados, 42
hematocrito, 28, 39-40
hemoglobinometría, 24
hemoglobinómetros portátiles de lectura directa, 27-8
índices eritrocíticos, 30, 37
método
de la cianmetahemoglobina, 24-6
de referencia del International Council for Standardization in Haematology (ICSH), 29-30
del cianuro de hemoglobina, 24-6
del microhematocrito, 28-9
radioisótopos diagnósticos, 305-21
recuento
celulares manuales, 30
de basófilos, 30
de eosinófilos, 30
de eritrocitos, 37
de leucocitos totales, 41
de plaquetas, 32, 44-5
de reticulocitos, 32-34, 45
diferencial automatizado, 42-3
manual del diferencial de leucocitos, 30-2
sanguíneos automatizados, señalización, 47
sistemas de recuento, 36
técnicas de recuento sanguíneo automatizado, 36-1
volumen corpuscular medio, 39-40
Temperatura de disolución (TD), 481
Terapia
anticomicial, 141
antiplaquetaria, 410
profiláctica, 404
trombolítica, 409-10
Tercera edad, 17
Tert-butildimetilsilil del AMM, 152
Tetrabromofluoresceína, 53
Tetraciclina, 221
Tetracloruro de carbono (CCl4), 241
Tetrafluoroborato, 54
Tetrámeros de cadenas, 263
Tetrametilbencidina, 163
Thermus aquaticus, 478
Thrombotest de Owren, 400
Tiempo
de Ancrod, 349
de coagulación
activada (TCA), 405
de cefalina caolín (KCCT), 343
del caolín (TCC), 381, *382*
de lisis de euglobulina, 14, 390
de protrombina (TP), 14, 328, 342-3, 380, 399-401, 575
de reptilase, 349
de respuesta tras la llegada de la prueba (TRT), 545
de trombina (TT), 14, 349, 399
de tromboplastina parcial activado (TTPA), 14, 328, 341, 343, 370, 400
del veneno de la víbora de Russell diluido (TVVRD), 381-2
parcial de tromboplastina con caolín (PTTK), 343
Tinción
automatizada, 56-7
citoquímica, 100
con azul de Prusia, 268, *270*
con bromuro de etidio, 495
con eosina, 109
de Giemsa, 54, 55-6, 60, 62
de gotas gruesas, 60
de Jenner, 53-2, 56
de las cadenas ligeras de la inmunoglobulina de superficie, *290*
de Leishman, 53, 55, 56, 61, 275
de los frotis de médula ósea, 575
de May-Grünwald, 55
de Perls, 53, 85, 100, 106, 223
de Romanowsky, 53-5, 58, 283
extensiones sanguíneas, 77
frotis, 278
microfotografías, 56
de Wright, 53
doble, *289*
en lecho horizontal, 57
fluorescente, 35
normalizada de Romanowsky, 55-6
simple, 289
Tiocianato, 54
de guanidina (GTC), 502
Tipificación
ABO, rápida, 463-64
D rápida, 463-64
Rh D, 214
sanguínea
anticuerpos, 575
pruebas de histocompatibilidad cruzada, 574
Tipos de autoanticuerpos, 206
Titulación, 217
de anticuerpos, 433-4
Títulos de aglutinación, 218, 332
Tomografía
computarizada por emisión de fotón único (SPECT), 307
por emisión de positrones (PET), 307, 320
Tosoh Eurogenetics, 150
Transcobalamina, 149
Transfusión sanguínea
desarrollos recientes, 450-1
detección de anticuerpos, 457-9
determinación del grupo D, 453-57
enfermedad hemolítica del recién nacido, 464-9
identificación de los anticuerpos, 459-60
investigación de una reacción a la transfusión, 471-72
pruebas
de compatibilidad, 469-71
de histocompatibilidad cruzada, 461-3
reacción a, 471
selección y transfusión de eritrocitos, 460-1
serología prenatal del recién nacido, 464-8
sistemas de compatibilidad pretransfusión, 450-2
tipificación ABO, 452-32
transfusiones urgentes, 463-64
Transporte de las muestras, 558-9
Trasplante de células madre (TCM), 492
Trastorno(s)
leucocitarios, 527-8
linfoproliferativos crónicos, 528
mieloproliferativo (TMP), *97*, 273, *380*, 528
Tratamiento con anticoagulantes orales
estandarización del tratamiento, 400
selección de pacientes, 399-400
Triatominae, 64
Trifosfato de adenosina (ATP), 185
Triglicéridos (TG), 148, *380*
Trimetiltionina, 53
Triosa fosfato isomerasa, *187*
Tripanosomas, 60
Tripanosomiasis, *64*, 62-5
africana, *64*, 62
americana, 64
Triton X-100, 25, 61
Trofozoítos, *63*
Trombastenia de Glanzmann, 527
Trombocitemia, *96*
Trombocitopenia, 96, 321, 407, 526
Trombocitosis, 523
Tromboelastógrafo, 395

Tromboembolismo venoso (TEV), *380*, 483
Trombofilia
déficit de la proteína C (PC), 385-90
estados trombóticos heredados, 384-5
factor VIIa, 395
hiperreactividad plaquetaria, 394
homocisteína, 395
introducción, 379
marcadores de activación de la coagulación, 395
prueba global de coagulación, 395
pruebas del anticoagulante lúpico (LAC), 380-4
sistema fibrinolítico, 390-40
β-tromboglobulina, 14, 20
Tromboplastina internacional de referencia, 342
Tromboplastinas, 342, 400, *401-3*
Trombopoyesis, regeneración, 45
Trombosis, diagnóstico, *380*
Tromboxano
A_2 (TXA_2), 327
B_2 (TXB_2), 328
Trypanosoma
brucei
gambiense, 62
rhodesiense, 62
cruzi, 64
TTPA. Véase *Tiempo de tromboplastina parcial activado*
Tuberculosis, 94, 108, 523
Tubos
al vacío recubiertos de silicona, 2
de cristal de cuarzo, 27
ópticos equivalentes, 27
Turbidez, 24
nivel, 340, *341*
Tween 20, 119

U
United Kingdom
Accreditation Service (UKAS), 548
Clinical Pathology Accreditation Ltd (CPA), 548
Medical Devices Agency (MDA), 516, 546, 562
Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency (MHRA), 36, 121
National
Blood Service, 463, 473
External Quality Assessment Scheme (EQAS), 453, 569
Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), 562
Ultrasonidos, 319
Ultravioleta (UV)
fluorescencia, 261
luz, 169, 187
Unopette, 4
Uremia, 82
Urobilina, 168-9
Urobilinógeno, 168-9
Uroporfirina, 169-171
Utilidad de la prueba, 539

V
Vacuolas, 7, 91
Valor neonatal medio, 197
Valoración
del volumen de trabajo, 537
externa de la calidad (EQA), 561, 577
Valores normales de referencia, 13, *13*, 13-16
Variaciones fisiológicas, 104-5
Variantes estructurales, *240*
Vasoconstricción, 326
VCM. Véase *Volumen corpuscular medio*
Vector, 507
Velocidad de sedimentación globular (VSG), 5, 15, 20, 131, 511
Veneno
de la *Pseudonaja textilis*, 383
de la víbora de Russell (RVV), 381
Verosimilitud, ratio, 539
Vía de Embden-Meyerhof, 186-187
Vida media celular (VCP), 318
Virkon, 556
Virus
de Epstein-Barr, 515, 526
de la hepatitis, 555
Viscosidad de la sangre total, 515
Vitamina B_{12}, 148
análisis, 8, 528
pruebas de absorción, 305
VLin integral, 339, *340*
Volumen
corpuscular medio (VCM), 5, 14, 15-16, 20, 30, 39-40, 73, 131, 140, 162, 181, 205, 237, 563, 568
plaquetario medio (VPM), 20, 45
sanguíneo (VS), 305
total (VST), 310
VPM. Véase *Volumen plaquetario medio*
VSG. Véase *Velocidad de sedimentación globular*

W
Westergren
método, 512
tubo, 6
Western European Laboratory Accreditation Co-operation (WELAC), 548
Wratten 74, 25-27
Wright-Giemsa, 53
Wuchereria bancrofti, 65

X
XE2100, contador automatizado de sangre completa, 42
Xerocitosis hereditaria, 182
Xilol, 57

Y
Yodo radioactivo (^{125}I), 309, 363

Z
ZAP-70, 291, *299*, 300
Zidovudina, 524
ZZAP
prueba de absorción, 210
reactivo, 214
tratamiento, 214

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.