

APENDICE 5

La coloración de Giemsa en hematología

Coloración de Giemsa

Reactivos

Solución de colorante de Giemsa (por ejemplo, BDH/Merck Ltd, Hunter Boulevard, Magna Parka, Lutterworth, Leicestershire, R66, Producto 35086). La calidad de diferentes lotes de colorante de Giemsa puede variar. Verificar cada lote nuevo en un organismo conocido antes de utilizarlo sistemáticamente.

Agua destilada tamponada con fosfatos, pH 7,2.

| | |
|---------------------------|-----------|
| KH_2PO_4 | 0,7 g |
| Na_2HPO_4 | 1,0 g |
| Agua destilada | 1,0 litro |

Metanol absoluto (Analar). Este debe almacenarse en una botella bien cerrada para prevenir la absorción de agua.

Método

1. Preparar una extensión delgada como para un examen hematológico corriente. Verificar que la extensión tenga una buena «cola» y no llegue lateralmente hasta los bordes del portaobjetos.
2. Dejar secar la extensión al aire y fijarla con metanol durante un minuto.
3. Hacer caer el exceso de metanol y colocar el preparado con la cara hacia abajo sobre una bandeja para coloración de portaobjetos.
4. Utilizando una jeringa de 20 ml y una aguja de punta roma; diluir el colorante madre de Giemsa a 1:10 con agua destilada tamponada. Mezclar bien y expeler el aire.
5. Con la jeringa y la aguja, infiltrar la solución colorante bajo el portaobjetos, procurando no atrapar grandes burbujas de aire. Dejar teñir durante 25 a 30 minutos.
6. Al finalizar el tiempo de coloración, enjuagar brevemente los portaobjetos con agua del grifo y dejarlos escurrir en posición vertical hasta que queden secos. Los posibles parásitos deben examinarse con más detalle utilizando un objetivo de inmersión en aceite. Un objetivo de inmersión en aceite con aumento de 50X ó 63X es excelente para un

examen preliminar; deben someterse por lo menos 1000 campos al examen de un microscopista adiestrado.

Notas:

Se recomienda vivamente el método de la jeringa para diluir el colorante madre de Giemsa (punto 4 *supra*) porque, una vez diluido con agua, éste comienza a precipitar y la exposición al aire acelera esa precipitación. La dilución debe, pues, prepararse inmediatamente antes de proceder a la coloración; el colorante madre diluido no debe conservarse. Además, si el portaobjetos se coloca con la cara hacia abajo sobre la bandeja, se reduce la precipitación del colorante y el precipitado que se forme caerá de la extensión. Cuando se buscan parásitos intracelulares pequeños, es muy importante que los preparados teñidos estén limpios.

Para diluir el colorante de parásitos de la sangre *se debe* utilizar agua tamponada a un pH de 7,2. Solamente a este pH alcalino se puede diferenciar de forma apropiada entre el material nuclear y el citoplásmico del parásito.

Determinación del valor hematócrito

El valor hematócrito es el porcentaje del volumen sanguíneo ocupado por los glóbulos rojos. Un valor hematócrito bajo es indicativo de anemia. Para determinar el valor hematócrito, llenar directamente con sangre capilar (por ejemplo, del dedo o de la oreja, extraída mediante punción con una lanceta) o venosa, extraída con un anticoagulante, un tubo capilar microhematócrito heparinizado. Sellar los tubos en un extremo con plasticina o aplicando calor. Llenar los tubos por capilaridad, dejando sin llenar 10-15 mm en el extremo del tubo que se vaya a sellar. Centrifugar el tubo en un centrifugador hematócrito (a 12 000 g), con el extremo sellado del tubo contra el borde exterior de goma de la placa centrífuga. Centrifugar durante 5 minutos y leer el valor hematócrito en un lector microhematócrito colocando la base de la capa de glóbulos rojos en el cero y el extremo superior de la capa de plasma en la línea 100. La posición de la línea plateada se ajusta para que coincida con la interfaz entre glóbulos rojos/glóbulos blancos/plaquetas, y el volumen eritrocitario se lee utilizando la escala.

El valor hematócrito es la relación entre el volumen eritrocitario y el volumen sanguíneo.

Recuento leucocitario

Líquido de dilución de leucocitos:

| | |
|------------------------|----------------------|
| Acido acético glacial | 2 ml |
| Azul de metileno al 1% | 1-2 gotas |
| Agua destilada | hasta llegar a 98 ml |

Se destruyen los glóbulos rojos y se utiliza un colorante para teñir los glóbulos blancos. Para destruir las células, se introducen 20 µl de sangre en 0,38 ml de líquido de dilución de glóbulos blancos (1 en 20); se mezcla bien. Se llena una cámara de recuento hemacitómetro y se deja

reposar en una cámara húmeda durante 2 minutos. Se cuentan todos los glóbulos blancos presentes en una superficie de 4 mm².

$$\text{Recuento leucocitario} = \frac{\text{número de células contadas}}{\text{volumen contado (0,4)}} = \text{dilución} \times 10^6 = \text{número contado} \times 50 \times 10^6/l$$

El recuento leucocitario normal en diferentes grupos de edad es el siguiente:

| Grupo de edad | Recuento leucocitario normal |
|-------------------------------|-------------------------------------|
| Lactantes hasta 1 año de edad | 6-18 x 10 ⁹ /l |
| Niños de 1 a 10 años | 5-14 x 10 ⁹ /l |
| Adultos | 4-11 x 10 ⁹ /l |

Determinación de la hemoglobina (método de la cianometahemoglobina)

Solución de dilución de la sangre (solución de Drabkin, pH 7,0-7,4)

| | |
|----------------------------------|------------------------|
| Ferrocianuro de potasio | 200 mg |
| Cianuro potásico | 50 mg |
| Dihidrógeno ortofosfato potásico | 140 mg |
| Nonidet P40 | 1 ml |
| Agua destilada | hasta llegar a 1 litro |

Almacenar a temperatura ambiente, a oscuras (no congelar). **Esta solución es muy tóxica.**

Esta solución puede prepararse disolviendo tabletas normales de los componentes o diluyendo una ampolla de concentrado disponible comercialmente.

Añadir 20 µl de sangre extraída con un anticoagulante a 4 ml de reactivo, mezclar bien y dejar a temperatura ambiente durante 3 minutos. La absorbencia se lee en un colorímetro a 540 nm en comparación con la solución de reactivo blanco solo. La absorbencia de un patrón de referencia de cianometahemoglobina también se mide por separado en comparación con reactivo blanco.

La concentración de hemoglobina (g/l) se calcula de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Absorbencia de la muestra de prueba}}{\text{Absorbencia del patrón}} \times \frac{\text{Concentración del patrón} \times \text{factor de dilución}}{100}$$

Los valores normales son:

| Grupo de edad | Valores normales |
|----------------------|-------------------------|
| Niños de 1 a 6 años | 110-140 g/l |
| Varones adultos | 130-180 g/l |
| Mujeres adultas | 115-165 g/l |

Proteínas séricas totales

Reactivo de biuret

| | |
|---------------------------------------|------------------------|
| Sulfato de cobre (5 H ₂ O) | 3 g |
| Tartrato potásico sódico | 9 g |
| Ioduro de potasio | 5 g |
| NaOH | 24 g |
| Agua destilada | hasta llegar a 1 litro |

Reactivo de tartrato alcalino:

| | |
|--------------------------|------------------------|
| Tartrato potásico sódico | 9 g |
| Ioduro de potasio | 5 g |
| NaOH | 24 g |
| Agua destilada | hasta llegar a 1 litro |

Añadir 0,1 ml de suero a 5 ml de reactivo de biuret.

Añadir 0,1 ml de suero a 5 ml de solución de tartrato alcalino.

Dejar que ambos tubos reposen durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Establecer el cero del espectrofotómetro con un filtro de 540 nm utilizando 5 ml de reactivo de biuret mezclado con 0,1 ml de agua destilada.

Determinar la absorbencia del suero del paciente en el reactivo de biuret y restar la absorbencia en la solución de tartrato alcalino.

Las proteínas totales de la muestra del paciente pueden determinarse a partir de una curva de calibración preparada con 5 diluciones de una solución patrón de proteína o un suero de control que contenga una cantidad conocida de proteínas. Pueden obtenerse comercialmente patrones liofilizados que contienen cantidades conocidas de proteínas totales.