

- Coloque el torniquete de goma algunos centímetros por encima del lugar de la punción. Pida al paciente que apriete el puño lo que hará ingurgitar las venas
- Se escoge una vena apropiada para la punción. Con el dedo índice de la mano izquierda, se palpa el brazo hasta encontrar la mejor vena. Se limpia la zona de punción. Con alcohol al 70 % no se debe volver a tocar dicha zona. La aguja debe apuntar en la misma dirección que la vena.
- La sangre comenzará a penetrar en la jeringa. Tan pronto la aguja entre en la vena se afloja el torniquete y se retira la aguja.
- Se coloca una torunda de algodón sobre el sitio de la punción y se comprime con los dedos de la otra mano o se flexiona el codo.
- La sangre se vacía lentamente por las paredes de los tubos con el objeto de evitar hemólisis.
- Se retira la aguja de la jeringa y se pasa la sangre al tubo correspondiente con o sin anticoagulante.

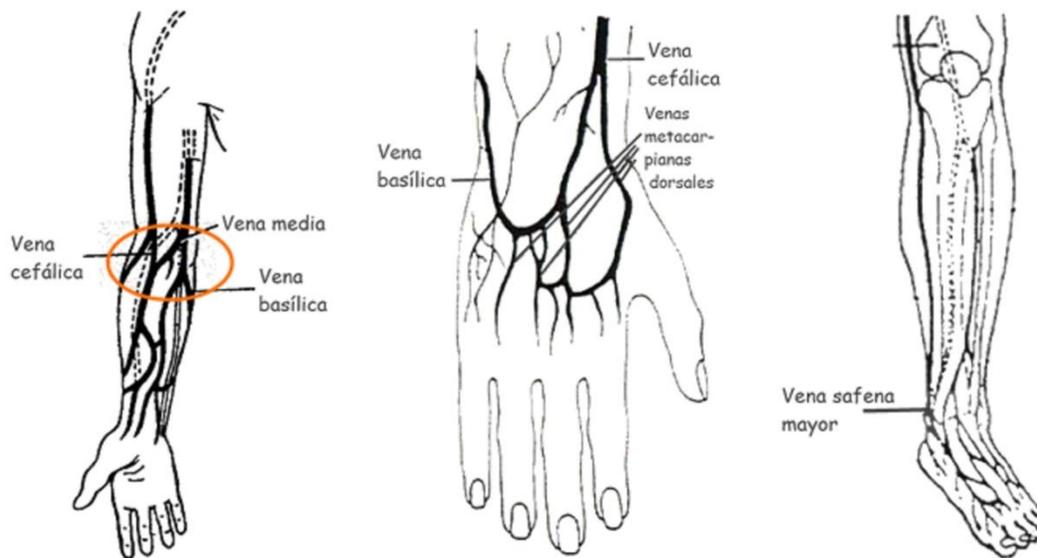


Figura 1:
Extracción de sangre venosa. Recuperada de:

https://www.google.com.mx/search?q=venopuncion&rlz=1C1HLDY_esMX701MX702&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi27rjf1sXTAhVpxoMKHTAfB2AQ_AUICcgB&biw=1164&bih=644#imgsrc=ZT1fab0KDqKI_M:



a) Prepare todo el equipo necesario.

b) Desinfecte el sitio, ligue el brazo.

c) Realice la punción.

d) Obtenga la sangre, retire la aguja.

Figura 2. <http://laboratorio-clinico-612.blogspot.mx/2012/06/toma-de-muestra-sanguinea.html>.

Material:

- 1.- Cinta masking tape. Por equipo.
- 2.- Torniquete, resorte o manguera de látex muy delgada. Individual
- 3.- Torundas con alcohol. Por equipo.
- 4.- Jeringa de 3 ml. de aguja punta negra. Individual.
- 5.- Un par de guantes de cirujano. Individual.
- 6.- 1 litro de clorasol. Para todo el salón.
- 7.- Un recipiente de boca ancha para desinfectar las jeringas. Por equipo.
- 8.- 2 cuadros de papel higiénico.

PRÁCTICA # 4 COLORACIÓN DE WRIGHT

cbc

A. Introducción

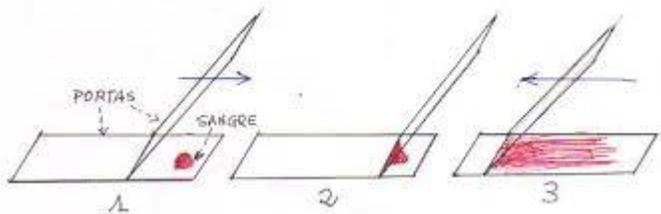
Con el fin de estudiar satisfactoriamente los frotis sanguíneos, es necesario colorearlos.

En la mayoría de los laboratorios los colorantes más empleados para la tinción hematológica se basan en el de Romanowsky constituido fundamentalmente con la mezcla de eosina (ácido) y azul de metileno (básico). Además se han incorporado el empleo de derivados por oxidación del azul de metileno que se conoce con el nombre de azures (A, B, C). Son los azures los responsables de la coloración púrpura o roja de ciertas estructuras.

Tanto la eosina como el azul de metileno son muy sensibles a las variaciones de pH de las diferentes estructuras celulares, de forma que las que tienen carácter básico fijan la eosina mientras que las que poseen propiedades ácidas fijan principalmente el azul de metileno.

Esto explica que las estructuras basófilas se tiñan de color azul mientras que los competente acidófilas adquieren un color rosado. La diferente afinidad de ciertas granulaciones citoplasmáticas por dichos colorantes permite clasificar a los leucocitos polimorfonucleares en 3 grupos:

- Granulocitos eosinófilos, en los que la granulación específica contiene sustancias de carácter básicos que fijan los colorantes ácidos y se tiñen de color rojo-naranja.
- Granulocitos basófilos, en los que la granulación específica posee sustancias de carácter ácido que fijan los colorantes básicos y se tiñen de color azul oscuro.
- Granulocitos neutrófilos, en los que la granulación específica posee compuestos de carácter neutro por lo que fijan ambos colorantes simultáneamente, de ahí que se tiñen de color pardo.



Dentro del grupo de colorante tipo Romanowsky los más utilizados son el de Wright, Giemsa y May-Grünwald-Giemsa, entre otras.

Figura 3. FROTIS SANGUÍNEO:

1. Tinción de Wright

Esta coloración es conocida como policromática debido a que produce varios colores. Es una solución de alcohol metílico de un colorante ácido (eosina) y otro básico (azul de metileno). El alcohol sirve como un fijador del frotis sanguíneo al portaobjetos. El amortiguador, que consiste en una solución tamponada, mantiene el pH del colorante y favorece la mejor absorción por los diferentes componentes celulares.

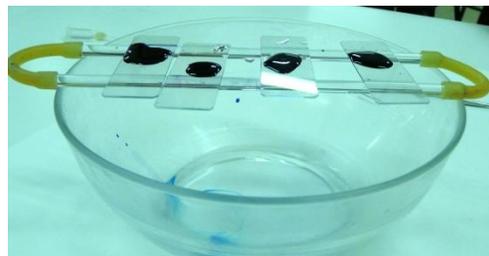


Figura 4. Puente de tinción.

Materiales:

- Colorante de Wright: para 100 mL se requiere de colorante de Wright (0.3g), metanol (97.0 mL) y glicerol (3.0 mL). Disolver en un mortero el colorante con el glicerol. Una vez disuelto se adiciona el metanol trasvasándolo a un frasco oscuro. Agitar. Filtrar antes de usar.
- Solución amortiguadora tamponada: en un litro de agua destilada se agregan 3.76 g de hidrofosfato disódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y 2.10g de fosfato de potasio dihidrogenado (KH_2PO_4). Mezclar todos los reactivos y guardar en frasco de vidrio en lugar fresco. Ajustar el pH a 7.2.
- Rejilla horizontal o soporte de tinción.

Técnica:

- Colocar el frotis secado al aire sobre una rejilla o cubeta de tinción con la sangre hacia arriba (ver figura 4). Cubrir completamente el portaobjetos o cubreobjetos con el colorante de Wright gota a gota. Dejarlo que permanezca en el frotis aproximadamente de 5-8 minutos, para fijar los glóbulos sanguíneos. El colorante deberá cubrir completamente el portaobjetos, pero no debe derramarse por los bordes. Deberá agregarse una cantidad adicional si éste se comienza a evaporar.
- Agregar directamente al colorante un volumen igual de amortiguador de Wright, para evitar la coloración débil. Esperar la formación de brillo metálico. Puede usarse de igual manera agua desionizada. Dejar actuar de 10-15 minutos.
- Lavar con agua en el chorro cuidadosamente hasta que la extensión presente un aspecto rosado al examinarlo a simple vista.
- Limpiar el dorso del portaobjetos con una gasa o algodón humedecido en alcohol para eliminar cualquier resto de colorante.

Secar al aire y observar con el microscopio con el objetivo de inmersión

Resultados:

- Los eritrocitos se observarán de color naranja o rosado. El citoplasma de los monocitos presentarán una tonalidad azul grisácea con gránulo rojizos bastante finos y sus vacuolas características. El citoplasma de los linfocitos presentará varias tonalidades azules.
- Los núcleos de los linfocitos y neutrófilos aparecerán de color púrpura oscuro. Los núcleos de los monocitos de color púrpura algo más claros (lila).
- Los gránulos de los eosinófilos son de color rojo-anaranjado intenso. Los gránulos de los basófilos púrpura azulado muy oscuro. Los gránulos de los neutrófilos se aprecian de color lila, bastante finos.
- Las plaquetas toman coloración violeta o púrpura.

Observaciones:

- Los tiempos varían de acuerdo a cada lote o tiempo de maduración del colorante. De ahí que si los frotis recién teñidos resultan demasiado pálidos se corrige aumentando el tiempo de tinción o disminuyendo el tiempo de lavado.
- Si en la preparación se observa precipitados de colorante puede ser debido a varias causas: lavado insuficiente al final del proceso, utilización de porta o cubreobjetos sucios, mala filtración del colorante, mala distribución del colorante a lo largo de la extensión por no mantenerse en posición horizontal.
- Durante la tinción el tampón fosfato controla el pH del colorante. Si el colorante es demasiado ácido la extensión resultará demasiado rojiza y si por el contrario es demasiado alcalina la precipitación presentará un aspecto azulado.

PRÁCTICA # 5

1.-TIPIFICACIÓN DE GRUPOS SANGUÍNEOS Y FACTOR Rh

2.-OBJETIVO.

El alumno efectuará en el laboratorio la tipificación de grupos sanguíneos y el factor Rh en placa ya que estas pruebas son de vital importancia en el momento de una transfusión.

3.-INTRODUCCIÓN.

El trabajo de G. Kahler y C. Milstein el año de 1975, en el departamento de Biología Molecular del Consejo de Laboratorio de Investigación Médica en Cambridge Gran Bretaña. Describen el desarrollo del primer Hibridoma*¹ productor de anticuerpos monoclonales. Esta abrió un campo en las áreas de Investigación y Diagnóstico.

La función in vitro de una célula plasmática maligna con otra normal, productora de un anticuerpo determinado (hibridoma), origina una línea celular permanente capaz de sintetizar una población perfectamente homogénea e ilimitada de dicho anticuerpo.

El reactivo hemoagrupador monoclonal anti - A, B, y AB se prepara inmunizando ratones con sustancias específicas de grupo. Cuando la respuesta inmunológica es demostrada, y el título obtenido es el adecuado, se extrae el bazo para obtener linfocitos productores de fusión con plasmacitoma.*²

Los linfocitos fusionados o hibridomas, se preparan en clonas. Cada clona se prueba en su potencia y en su especificidad. Posteriormente se seleccionan clonas hasta obtener las óptimas, que se hacen crecer en medios de cultivos de tejidos, enriquecidos con "Crecl" (marca registrada del suero fetal de ternera ORBI). El anticuerpo se obtiene del sobrenadante del medio.

En 1900 Landsteiner descubrió la aglutinación que se producía al mezclar los glóbulos rojos de un sujeto con los de otro.

Este descubrimiento lleva a Landsteiner a aceptar la existencia de tres fenotipos distintos en 1902.

Estas clasificaciones mencionadas reciben en la actualidad el nombre de sistema de grupo sanguíneo ABO. Landsteiner vio también que solamente se necesitaban dos antígenos para explicar los 4 grupos:

El primero tenía un antígeno (A), el segundo tenía el otro (B), el tercero tenía los dos (AB) y el cuarto tenía ningún antígeno (O).

El sistema ABO es el único en el sentido en que la sangre de los individuos a los que les falta uno o ambos antígenos A/B posee el (los) anticuerpo(s) correspondiente(s). La presencia de solución salina concentrada que aglutine los anticuerpos anti - A y/o anti - B en plasma o en suero adulto convierte al sistema ABO en el sistema de grupos sanguíneos más importante en la terapia de transfusión.

También reconoció la relación recíproca en una muestra de sangre entre los anticuerpos del suero y los antígenos de los glóbulos rojos. En cada caso son muy pocas excepciones solamente se encuentran anticuerpos anti-A, anti-B, o ambos en el suero cuando los glóbulos rojos carecen del antígeno correspondiente

| GRUPO SANGUÍNEO | ANTIGENO DEL GLÓBULO ROJO | ANTICUERPO DEL SUERO |
|-----------------|---------------------------|----------------------|
| “O” | O | Anti-A y Anti-B |
| “A” | A | Anti-B |
| “B” | B | Anti-A |
| “AB” | AB | Ninguno |

En 1939, Lavine y Stetson descubrieron que el suero de una mujer que dio a luz a un óbito aglutinaba eritrocitos de 85% de adultos humanos. Al siguiente año Landsteiner y Wiener informaron sobre un sorprendente descubrimiento de que el suero de conejos y cobayos inmunizados con glóbulos rojos de mono, sino los de la mayoría de los neoyorquinos caucásicos. Los individuos cuyos glóbulos rojos se aglutinaban con estos sueros, se dominaron “Rh positivo” y los otros “Rh negativos. Estas observaciones sugirieron la presencia de un nuevo sistema de antígeno de los glóbulos rojos y estimularon la investigación inmediata de la naturaleza de las reacciones transfusionales intragrupalas, previamente inexplicables y las incompatibilidades entre madre e hijo, que producen la eritroblastosis fetal.

4.- FUNDAMENTO.

La aglutinación de eritrocitos, por un antisuero específico es un resultado positivo, que indica la presencia del correspondiente antígeno en la membrana de los eritrocitos estudiados. La ausencia de aglutinación indica un resultado negativo, es decir, el antígeno correspondiente no se encuentra en la membrana de los eritrocitos.

5.- Material y reactivos

- . Placas excavadas de porcelana o de vidrio.
- . Aplicadores de madera.
- . Lancetas estériles.
- . Torundas alcoholadas.
- . Antisuero (anti – A, anti - B, anti – AB y anti - D o Rh)
- . Sangre total

6.- PROCEDIMIENTO

Las pruebas de grupo sanguíneo necesitan cierta delicadeza de mano y una gran cantidad de concentración mental.

La importancia de colocar el suero correctamente y las células correctas en el tubo correcto y registrar correctamente los resultados, es casi demasiado obvio como para mencionarlo. Sin embargo para lograr precisión parece necesario efectuar un largo aprendizaje.

MÉTODO EN PLACA (DIRECTA).

- A) Preparar una suspensión de glóbulos rojos al 2% en solución salina fisiológica, (al 0.85% o 0.9%), o bien proceder con sangre total.
- B) Colocar una gota de sangre total en cuatro excavaciones de placa, previamente marcadas para no confundirse.
- C) Añada a la primera gota de sangre una gota de suero anti - A, a la segunda, una gota de suero anti - B, a la tercera una gota de suero anti - AB y a la cuarta una gota de suero anti – D o Rh.
- D) Con ayuda de un aplicador de madera mezclar cada uno de ellos (debe emplearse, un segmento de aplicador para cada uno).
- E) Agite suavemente cada una de las placas o la placa con movimientos suaves y circulares de balanceo durante 30 segundos aproximadamente.

F) Lea el resultado; si hay duda, deje reposar la placa por un minuto aproximadamente y lea nuevamente la hemoaglutinación.

INTERPRETACIÓN:

Si al reaccionar el Rh o anti-D con la sangre del paciente presentando aglutinación indicará que la muestra es positiva, es decir Rh positivo.

En caso contrario cuando no presente aglutinación la sangre será negativa, es decir Rh negativa.

Hay una prueba que se realiza para poner de manifiesto los anticuerpos presentes en cada uno de los grupos sanguíneos, a esta prueba se le llama **PRUEBA INVERSA DE ABO**, esta prueba se realiza con suero del paciente (2 gotas) y glóbulos rojos conocidos al 2% en solución salina al 0.9% (1 gota), gr.A, gr B, gr AB y gr O, se centrifuga a 1000r.p.m. durante 1 minuto.

Se resuspende y se observa la presencia o ausencia de aglutinación.

INTERPRETACIÓN.

Si el grupo sanguíneo del paciente es "A" presentará aglutinación en "A" y en "AB", y si el grupo sanguíneo es "O" no presentará aglutinación en "A ni en B", ya que "A" presenta anticuerpos contra "B" y "B" presentará anticuerpos contra "A" por lo tanto el grupo "O" presentará anticuerpos contra ambos.

7.- TRABAJO DEL ALUMNO:(RESULTADOS)

Ø Realizar una tabla con todos los grupos sanguíneos del grupo

Ø Reportará los porcentajes de grupo sanguíneos obtenidos en todo el grupo

8.- CUESTIONARIO.(DISCUSIÓN DE RESULTADOS)

1. ¿Qué son los grupos sanguíneos?

2. ¿Qué es el factor Rh?

3. ¿Qué otros sistemas de grupos sanguíneos diferentes al ABO y el factor Rh se conocen?

4. ¿Qué importancia tiene la tipificación de grupos sanguíneos?

5. ¿Qué importancia tiene la prueba D^U en la tipificación de grupos sanguíneos?

9.- CONCLUSIÓN

10.- BIBLIOGRAFÍA

*1.- Un hibridoma es una línea celular híbrida obtenida mediante la fusión de un linfocito B productor del anticuerpo específico de interés, con una línea celular de mieloma que no produce inmunoglobulina propia. Se obtiene así una línea celular inmortal capaz de expresar el anticuerpo de interés, que se aísla del sobrenadante.

*2.- Es un conjunto de células plasmáticas que se encuentran en una sola localización en la médula ósea, en el tejido blando o en el hueso.

Plasma: Es el líquido de la sangre en el cuál los glóbulos rojos, los glóbulos blancos y las plaquetas se hallan suspendidas.

Como hacer el reporte:

<http://carmelo-bc.jimdo.com>