



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE
ANÁLISIS CLÍNICOS**

Responsable de la elaboración: MC. Alberto Garfio Romero y QFB. Guadalupe Estrada Sánchez

**Elaboración: Agosto 2015
Actualización: agosto 2018; noviembre 2021**

PRÓLOGO

En los últimos años ha aumentado considerablemente el interés de la aplicación de los análisis clínicos veterinarios en el diagnóstico de patologías en animales. El área de Patología Clínica tiene gran importancia en esta aplicación porque ofrece información adicional al veterinario para realizar un diagnóstico más preciso que conducirá al tratamiento específico, es decir, al tratamiento de la causa determinante de la enfermedad, en lugar de un tratamiento exclusivamente de los síntomas de ésta.

Actualmente existe un gran número de pruebas Bioquímicas especialmente útiles en los estudios clínicos, y es claro que el mayor crecimiento y el mayor reto en patología clínica serán del área de la química. Por ejemplo cada año aumenta el número de enzimas mensurables que sabemos se alteran en las enfermedades y cuyos cambios pueden ser aplicados en el diagnóstico.

El presente manual pretende ofrecer una guía de técnicas y procedimientos que se realizan en el Laboratorio Patología Clínica para lograr así resultados más óptimos y confiables.

Para lo anterior se plantean una serie de pasos a seguir desde la toma de la muestra, pasando por las determinaciones químicas hasta la obtención de los resultados.

ÍNDICE

Práctica.- 1 Reconocimiento de material y equipo de laboratorio.

Práctica.- 2 Toma y Envío de muestras.

Práctica.- 3 Preparación, tinción de frotis sanguíneo y observación de eritrocitos y leucocitos.

Práctica.- 4 Hematología: Recuento de Leucocitos y Eritrocitos.

Práctica.- 5 Recuento diferencial y Estimado de plaquetas.

Práctica.- 6 Hemograma. Biometria Automática, Microhematocito y proteínas totales.

Práctica.- 7 Pruebas de coagulación. Tiempo de sangrado, retracción del coágulo y prueba de fibrinógeno.

Práctica.- 8 Pruebas Cruzadas.

Práctica.- 9 Transfusión Sanguínea.

Práctica.- 10 Pruebas específicas para evaluar hígado

Práctica.- 11 Urianálisis o Examen General de Orina.

Práctica.- 12 Diagnóstico de brucelosis por aglutinación en placa

PRÁCTICA I.- RECONOCIMIENTO DE MATERIAL Y EQUIPO DE LABORATORIO

I. INTRODUCCIÓN.

Es fundamental conocer el equipo y material de laboratorio comúnmente usado en Patología Clínica para facilitar el desenvolvimiento de los alumnos en prácticas posteriores. El Laboratorio de Patología Clínica es una herramienta primordial para el área médica, ya que por medio de este se diagnostican diferentes patologías y además se realizan estudios para establecer el tipo de tratamiento que se debe administrar al paciente, al igual que el seguimiento del mismo.

Hay que tener siempre presente que los errores humanos y las prácticas inadecuadas comprometen la seguridad en el laboratorio, por lo que es prioritario que se establezcan y adopten normas apropiadas básicas para el trabajo. Hace conciencia de los riesgos que se presentan al trabajar en el laboratorio.

Establece las medidas generales de precaución y normas básicas para la prevención de accidentes que se pueden presentar

II. COMPETENCIAS A DESARROLLAR.

El estudiante es competente en reconocer el material de laboratorio y el equipo básico comúnmente usado en Patología Clínica, para su correcta utilización en procesos posteriores en el diagnóstico clínico a lo largo del semestre.

RECONOCIMIENTO DE EQUIPO DE LABORATORIO.

Describir la operación de algunos de los equipos

El microscopio es un equipo que consta de un juego de lentes que permiten al ojo humano observar detalles que a simple vista es imposible observar. El uso de este equipo en los laboratorios clínicos, permite determinar la presencia de parásitos, larvas, cristales, restos de tejido, componentes de la sangre y otros cuerpos.

El microscopio se compone básicamente de tres partes:

- Sistema Óptico. Constituido por lentes, espejos y prismas dispuestos en un tubo que amplían la imagen. Este incluye: Los oculares, el cuerpo binocular, y los objetivos.
- Sistema de Iluminación. Por lo general consta de un bombillo que puede ser de tungsteno (halógeno), el cual es controlado por un interruptor de encendido y un regulador de intensidad; además consta de un condensador, que tiene como función concentrar y enviar un haz de luz perpendicular a la muestra y luego al objetivo.
- Sistema Mecánico. Es toda la estructura del microscopio y lo compone: El revólver, la base, El Macrométrico y el Micrométrico, la base de platina, la perilla de platina en cruz, la perilla del porta condensador

Recomendaciones de uso

De un buen uso y manejo del microscopio depende el funcionamiento continuo de éste. Es importante tomar muy en cuenta las siguientes recomendaciones:

- a. El microscopio debe ser cubierto con cobertores de tela, no con plásticos, ya que estos por el calor que producen, permiten la formación de hongos en los lentes.
 - b. Nunca debe ser expuesto directamente a los rayos del sol, ni cerca de sustancias tóxicas, ni cerca de lavaderos. Tampoco deben estar en el mismo mueble donde se encuentran equipos que producen vibración.
 - c. El polvo se encuentra prácticamente en todo lugar, ocasionando serios problemas en las partes mecánicas que se deslizan sobre guías con extrema precisión, si estas guías están sucias, el polvo con la lubricación hace las veces de esmeril o lija, ocasionando desajustes en los movimientos, por lo que será necesario limpiar y lubricar periódicamente.
- Cualquier anomalía en el microscopio, reporte al encargo del lab.

CENTRÍFUGAS.

Las centrífugas son equipos médicos utilizados en los laboratorios, clínicas y otros, para la separación de solutos de sus solventes. Por ejemplo en la rama de laboratorio clínico, para el análisis de sangre, por lo general es necesario separar el plasma de los otros componentes para poder ser analizado.

Centrífugas Clínicas (para separación de sueros o plasma) de baja velocidad (Macrocentrífuga, entre 2,000 y 6,000 R.P.M. aproximadamente), Centrífugas para microhematócritos (Microcentrífuga entre 10,000 y 18,000 R.P.M. aprox.) y las ultracentrífugas (de 20,000 hasta 75,000 R.P.M.) para la separación de proteínas.



III. MATERIAL Y EQUIPO.

Pipetas
Microscopio binocular
Balanza granataria
Espectrofotómetro
Centrifugas
Baño maría
Microscopio
Balanza analítica
Centrifuga capaz de alcanzar 3500 r.p.m.
Equipo vets –
Centrifuga M-600.
Espectrofotómetro.
Microscopio multicabezal.

IV. PROCEDIMIENTO.

Se dará una breve explicación del material a utilizar así como el equipo y funcionamiento de este.

Además se hará mención de otras reglas como prerequisite para la entrada al laboratorio como son:

- Se tomarán 10 minutos de tolerancia, después del horario establecido.
- Es indispensable llevar la muestra con la cual se va a trabajar.
- Utilizar la bata dentro del laboratorio.

V. RESULTADOS OBTENIDOS.

Al terminar la práctica será: un estudiante capaz de conocer el equipo y material con el que estará en contacto directo a lo largo del semestre.

Sistema de evaluación:

Asistencia y reporte

VI. CONCLUSIONES

Contrasta la información bibliográfica de tu introducción con tus observaciones, incluye información relacionada con lo mencionado en la introducción.

VII. FUENTES DE INFORMACIÓN.

Benjamin m. Maxime. 1984. Manual de Patología Clínica en Veterinaria. 1984. Ed. Limusa.

Bush. B. M. 1999. Interpretación de los Análisis de Laboratorio para Clínicos de Pequeñas Especies. Ed. Harcourt.

Bush. B. M. 1982. Manual del laboratorio veterinario de análisis clínicos.

Coles H. Embert. 1989. Diagnóstico y Patología en Veterinaria. 4ª. Ed. Interamericana/ Mc Graw-Hill.

PRÁCTICA 2.- TOMA Y ENVÍO DE MUESTRAS

INTRODUCCIÓN.

Los servicios del laboratorio de diagnóstico pueden ser una valiosa ayuda para el veterinario, porque podrá hacer diagnósticos más precisos y tendrá la información necesaria para establecer medidas terapéuticas o preventivas.

La muestra seleccionada deberá ser representativa del padecimiento. Se enviarán varias muestras del mismo lugar procurando muestrear también a un animal aparentemente sano.

La obtención de resultados significativos en cualquier procedimiento de laboratorio. Requiere por un lado, que la muestra sea extraída en forma correcta y por otro que ésta sea preservada de la mejor manera posible para evitar su deterioro antes de llegar al laboratorio. No es posible tener alguna confianza en resultados obtenidos por el examen de muestras inadecuadas o mal preservadas.

El procedimiento más común para la toma de una muestra de sangre en especies mayores es la punción de la vena yugular; en los porcinos las venas marginal de la oreja y la cava anterior, en los perros y gatos las venas marginales de la oreja y femoral.

II. COMPETENCIAS A LOGRAR.

El alumno será competente para utilizar las técnicas básicas de la toma de muestras para el envío al laboratorio y su análisis en animales vivos; cuando maneje y sujete a los animales, poniendo en práctica los conocimientos necesarios de anatomía y propedéutica clínica, evitando situaciones de stress y sufrimiento innecesario; utilizando como medio de apoyo el laboratorio para poder llegar a un diagnóstico y llevando un registro con el control de muestras.

III. MATERIALES Y EQUIPOS.

- Jeringas
- Torundas
- Sangre
- Centrifuga capaz de alcanzar 3500 r.p.m. (
- Agujas calibre 21 G x 32 mm
- Tubos monoject 15% EDTA (K3) estériles de 5 ml.
- Pipetas Pasteur Baxter
- Tubo de Wintrobe

MEDIDAS PREVENTIVAS

Todo el material punzante, como agujas o capilares, debe descartarse en recipientes especiales para tal fin.

Después de procesar cada animal, todas las gasas, algodones sucios, toallas de papel y otros desperdicios se colocarán en bolsas específicas para tal fin.

USO DE LOS GUANTES

Usar guantes limpios, no necesariamente estériles, previo al contacto con: Sangre, Fluidos corporales, secreciones, excreciones, mucosas y materiales contaminados. Para procedimientos invasivos se deben usar guantes de látex, estériles y luego

IV. PROCEDIMIENTO.

Las muestras de sangre para estudio hematológico deberán de ser recolectadas en frasco con anticoagulante. Para estudios serológicos o de química sanguínea se tomarán sin adicionar anticoagulante, procurando no agitar los frascos para evitar la hemólisis.

Orina. Para estudio físico, químico y de sedimento se recolectarán en frascos limpios, si se requiere urocultivo se utilizarán frascos estériles.

IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS.

En la identificación deberán incluirse los siguientes datos:

- a. Nombre del propietario.
- b. Dirección y teléfono.
- c. Datos del animal.
- d. Datos clínicos.
- e. Tratamiento y respuesta.
- f. Conservador utilizado.
- g. Diagnóstico presuntivo.
- h. Estudio solicitado.

ENVIO DE MUESTRAS.

Para el envío de las muestras a un laboratorio de diagnóstico, siempre debe tenerse en cuenta que los materiales son potencialmente infecciosos, por lo que el medio más eficaz y seguro para el envío de muestras es el mensajero directo: pero en algunas ocasiones se requiere del servicio postal, cuando esto último se usa, las muestras deben de reunir los siguientes requisitos:

-Deben de estar colocados en recipientes dobles (dos cajas o bien una caja y bolsas de plástico) ya que se mejora el aislamiento y aumenta la resistencia del recipiente.

- Como se mencionó anteriormente, las muestras deberán de ser enviadas en recipientes individuales, entre cada bolsa o frascos que contengan las muestras se coloca un material que amortigüe los golpes y absorba la humedad (se prefiere el aserrín, pero puede utilizarse papel o viruta), la caja externa se cierra de tal forma que todas las esquinas y tapas queden selladas con cinta adhesiva; esto a su vez aumenta la resistencia del recipiente. Es muy importante que en la envoltura de los paquetes sean puestos con claridad los siguientes datos: MATERIAL DE FACIL DESCOMPOSICIÓN PARA ANALISIS, MENEJESE CON CUIDADO, FRAGIL. Con el fin de que el material biológico llegue lo más pronto posible al laboratorio, deberá considerarse la conveniencia de la forma de envío (aérea o por carretera, ya sean por flete en líneas comerciales o vehículos particulares, además al remitir la muestra, es conveniente comunicarse inmediatamente al laboratorio, indicando el medio de transporte, línea comercial empleada y hora probable de arribo a su destino, así como el número de guía sanitaria).

No es recomendable enviar muestras a los laboratorios de diagnóstico los fines de semana, período cercano a vacaciones, días festivos ya que se corre el peligro de que éstas no sean recibidas.

V. RESULTADOS.

Al terminar la práctica será un estudiante competente para tomar y enviar muestras al laboratorio, cuidando el bienestar animal, utilizando ésta técnica cada vez que requiera y durante el semestre de práctica

VI. CONCLUSIONES

Contrasta la información bibliográfica de tu introducción con tus observaciones, incluye información relacionada con lo mencionado en la introducción.

VII. FUENTES DE INFORMACIÓN.

Benjamin m. Maxime. 1984. Manual de Patología Clínica en Veterinaria. 1984. Ed. Limusa.

Bush. B. M. 1999. Interpretación de los Análisis de Laboratorio para Clínicos de Pequeñas Especies. Ed. Harcourt.

Bush. B. M. 1982. Manual del laboratorio veterinario de análisis clínicos.

Coles H. Embert. 1989. Diagnóstico y Patología en Veterinaria. 4ª. Ed. Interamericana/ Mc Graw-Hill.

PRACTICA 3.- PREPARACIÓN, TINCIÓN DE FROTIS SANGUÍNEO Y OBSERVACIÓN DE ERITROCITOS Y LEUCOCITOS

I. INTRODUCCIÓN.

El extendido o frotis sanguíneo debe ser delgado, con una capa que permita la adecuada distribución celular, lo que facilita la Observación e identificación de las diferentes células sanguíneas y las posibles alteraciones.

El examen de un frotis bien teñido hecho por un observador experimentado puede proporcionar información más valiosa que cualquier otra prueba de laboratorio.

II. COMPETENCIAS A LOGRAR.

El alumno será competente para preparar y teñir frotis sanguíneos para lograr la observación de las células correctamente.

III. MATERIALES Y EQUIPOS.

Una muestra sanguínea tratada con EDTA, mínimo 3 mL

Hemocromo

Laminillas

portaobjetos

Cubreobjetos

Alcohol.

Papel extraza.

IV. PROCEDIMIENTO.

De preparación

1. Homogenizar la muestra de sangre perfectamente
2. Depositar una gota de sangre en un lado de un portaobjeto limpio.
3. Con el empleo de un porta de borde esmerilado se hace un frotis o extensión de sangre.

El porta con el que se hace la extensión debe deslizarse bien colocado y lo más perfectamente aplicado en su borde contra el otro porta sobre el que se hace la extensión. Sólo debe pasarse una vez, de forma continua e interrumpida.

4. Es conveniente realizar dos o tres extensiones, con el fin de seleccionar para la tinción la mejor lograda.
Las extensiones o frotis deben secarse al aire lo más rápidamente posible. La desecación se facilita con movimiento en forma de abanico, nunca soplando o por calor. La rápida desecación evita la deformación de los glóbulos sanguíneos.

Técnica de la tinción.

Método de Hemocolorante rápido.

1. Depositar el porta con la extensión de sangre encima del soporte de tinciones y éste sobre la cubeta.
2. Fijar con metanol absoluto dejar que se evapore.
3. Depositar cubriendo toda la extensión, con el reactivo No.1 del hemocrom , dejar actuar el colorante 30 segundos .
4. Lavar la preparación, hasta que arrastre todo el colorante.
5. Después de lavar cubrir con el reactivo No. 3 del hemocrom .
6. Tomar el porta por los cantos, secar al aire el porta.

V. RESULTADOS.

Buena confección de frotis y dibujos de lo observado en laboratorio.

VI. CONCLUSIONES.

Contrasta la información bibliográfica de tu introducción con tus observaciones, incluye información relacionada con lo mencionado en la introducción.

VII. FUENTES DE INFORMACIÓN.

Gregg L. Voigt. 2003. Conceptos y Técnicas Hematológicas para técnicos veterinarios. Ed. Acribia.

Benjamin m. Maxime. 1984. Manual de Patología Clínica en Veterinaria. 1984. Ed. Limusa.

Bush. B. M. 1999. Interpretación de los Análisis de Laboratorio para Clínicos de Pequeñas Especies. Ed. Harcourt.

Bush. B. M. 1982. Manual del laboratorio veterinario de análisis clínicos.

Coles H. Embert. 1989. Diagnóstico y Patología en Veterinaria. 4ª. Ed. Interamericana/ Mc Graw-Hill.

.

PRÁCTICA 4. HEMATOLOGÍA: RECUENTO DE LEUCOCITOS Y

ERITROCITOS

I. INTRODUCCIÓN.

La sangre se deposita en un frasco que contenga anticoagulantes como EDTA, oxalato, heparina, etc. Para efectuar la mayor parte de los exámenes hematológicos son suficientes 5 ml. de sangre. Una gota de una solución al 10% de las sales dipotásicas y disódicas del ácido etilendiaminotetracético (EDTA) evita la coagulación de 5 ml. de sangre si se utiliza en forma de polvo se emplean 5 mg.

II. COMPETENCIAS A LOGRAR.

EL alumno será competente de lograr un recuento de leucocitos y eritrocitos correcto.

III. MATERIALES Y EQUIPOS.

Glóbulos blancos.

Hematocitómetro o cámara de Neubauer

Pipeta de Thomma para blancos

Tubo de hule y boquilla

Sangre con EDTA

Microscopio

Solución de Turk (ácido acético glacial 3ml, violeta de genciana al 1% 1ml, agua destilada c.b.p. 100 ml)

GLOBULOS ROJOS

1.- Hematocitómetro o cámara de Neubauer

2.- Pipeta de Thomas

3.- Tubo de hule y boquilla

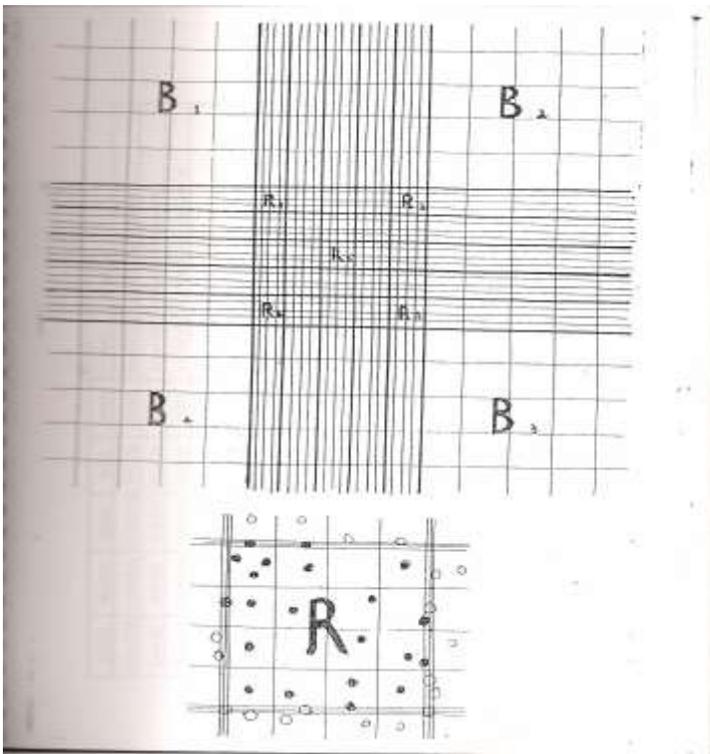
4.- Sangre con EDTA

5.-Diluyente de Harem (cloruro de mercurio 0.5g, cloruro de sodio 1.0g, sulfato de sodio 5.0g, y agua destilada 200ml) ó solución salina

IV. PROCEDIMIENTO.

Las pipetas se llenan mediante un tubo elástico aplicado a la porción superior con el cual se succionan los líquidos. Con aspiración suave, se hace subir sangre hasta la primera marca exactamente 0.5, secando el exceso con un papel secante. Debe tomar la precaución de detener la subida de líquido exactamente en la señal o ligeramente por encima de la misma. Luego se aspira la solución hasta la marca 101. Una vez llenadas las pipetas se agitan durante 2 o 3 minutos si es con la mano o 30 segundos con agitador de pipeta eléctrico. Se llena la cámara de recuento, la cual deberá estar completamente limpia y se deja transcurrir 1 a 2 minutos a que sedimente y así tome la posición que les corresponda. Se empezará a contar los leucocitos a lo largo de los cuatro cuadros grandes de las esquinas, que contienen 16 cuadros pequeños. El cálculo es simple solamente se multiplica por 50 el número total de leucocitos hallados en 4 mm².

Antes de proceder al recuento de eritrocitos se examinará la preparación con poco de aumento para apreciar la buena distribución, Para el recuento total de eritrocitos se emplea el objetivo seco fuerte (40 x); con su aumento se cuentan los glóbulos contenidos en cinco cuadros del centro de la cámara cuya cifra se multiplicará por 10,000 valor que representa el número de elementos rojos por milímetro cúbico de sangre.



V. RESULTADOS.

Los obtenidos en la práctica.

VI. CONCLUSIONES.

Contrasta la información bibliográfica de tu introducción con tus observaciones, incluye información relacionada con lo mencionado en la introducción.

VII. FUENTES DE INFORMACIÓN.

Benjamin m. Maxime. 1984. Manual de Patología Clínica en Veterinaria. 1984. Ed. Limusa.

Bush. B. M. 1999. Interpretación de los Análisis de Laboratorio para Clínicos de Pequeñas Especies. Ed. Harcourt.

Bush. B. M. 1982. Manual del laboratorio veterinario de análisis clínicos.

Coles H. Embert. 1989. Diagnóstico y Patología en Veterinaria. 4ª. Ed. Interamericana/Mc Graw-Hill

Gregg L. Voigt. 2003. Conceptos y Técnicas Hematológicas para técnicos veterinarios. Ed. Acribia.

PRÁCTICA 5. RECUENTO DIFERENCIAL Y ESTIMADO DE PLAQUETAS

I.-INTRODUCCIÓN.

Este conteo permite saber los porcentajes y valores absolutos de las distintas líneas de leucocitos, que permitiría determinar la presencia de diferentes reacciones. Así como el conteo plaquetario.

II-COMPETENCIA.

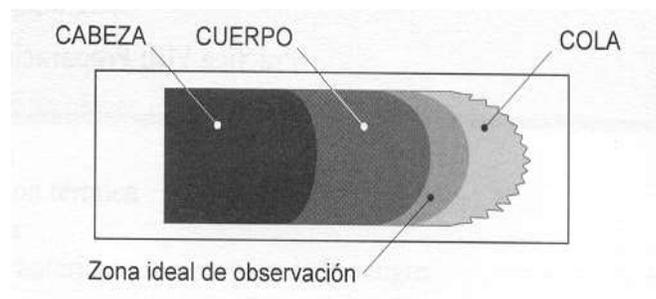
El alumno es competente en saber diferenciar correctamente cada uno de los elementos que constituyen la serie blanca al igual que las plaquetas.

III. MATERIALES Y EQUIPOS.

Portaobjetos
Cubreobjetos
Tinción de hemocolorante rápido
Sangre con EDTA

IV. PROCEDIMIENTO.

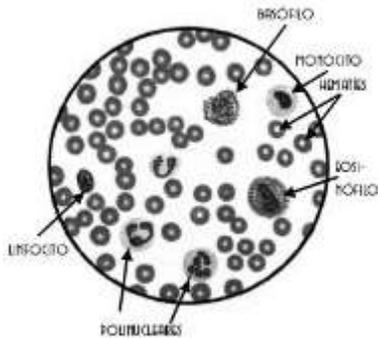
1. Hacer una extensión de sangre bien mezclada con sangre con anticoagulante EDTA o capilar con el método de atraer y arrastrar.
2. Seque rápidamente al aire o en una corriente de aire tibio.
3. Tiña el frotis con la técnica indicada en el apartado de tinciones soluciones.
4. Formas incorrectas de extendido de frotis



Examen microscópico.

1.- En 10x examinar calidad global del frotis, color y distribución de células, la formación de rodillos por los eritrocitos o la aglutinación de los mismos, debe revisarse con rapidez en busca de cualquier célula anormal grande o incluso parásitos inesperados.

2.- En 40x se selecciona la zona correcta del extendido donde se debe iniciar el recuento y evaluar la morfología celular. Para ello se selecciona el área en la que los eritrocitos estén superpuestos de 2 a 3 pero que la mayoría estén separados entre sí.

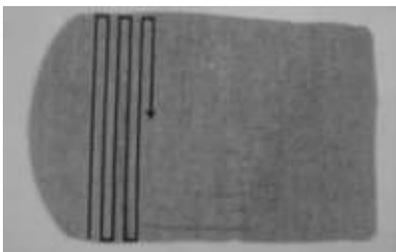


3.-En 100x se coloca una gota de aceite de inmersión y se enfoca con este objetivo, se cuentan y clasifican 100 leucocitos y se informan como porcentajes de leucocitos (valores relativos). La morfología de eritrocitos y plaquetas así como la estimación de estas últimas se hacen también con este.

Diferencial leucocitario.

Cuando el recuento leucocitario es mayor a $40.0 \times 10^9/L$ se debe realizar el conteo diferencial en 200 células.

El barrido del frotis debe hacerse en forma de zig-zag para lograr que la observación sea representativa como se muestra en la figura siguiente



Es importante incluir los bordes laterales para incluir las células más grandes como monocitos, linfocitos reactivos y células inmaduras.

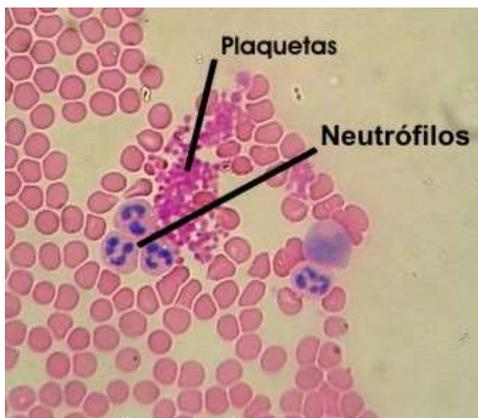
También se informan anomalías de leucocitos, granulaciones tóxicas (se informan como ligeras a marcadas o 1+ a 3+), cuerpos de Dohle, linfocitos reactivos (pueden reportarse como porcentajes o como aislados o abundantes).

La fórmula para convertir valores relativos en absolutos nunca debe omitirse ya que son los valores más útiles para la interpretación es la siguiente: $\text{Línea celular} \times 10^9/\text{L} = \% \text{ de línea celular contado} \times \text{total de leucocitos} (\times 10^9/\text{L}) / 100$

La morfología eritrocitaria se informa de acuerdo a las formas encontradas y además en cantidad como ligera, moderada y abundante o en escala de 1+ a 3+

ESTIMACIÓN PLAQUETARIA

1. Se lleva a cabo sobre el frotis de sangre teñido con Wright
2. Se evalúa el final del frotis en busca de agregados plaquetarios en caso de observarlos se señala que hay una cantidad “adecuada o suficiente”
3. Si no se observan estos se hace la lectura en 10 campos homogéneos con el 1 objetivo de 100x en donde se tiene una sola capa celular y se divide entre 10 para obtener un promedio y el promedio se multiplica por 20.
4. Cada plaqueta contada por campo a 100 X equivale a $20 \times 10^9/\text{L}$ plaquetas.



Plaquetas.

V. RESULTADOS.

Los que arroje la observación.

VI. CONCLUSIONES.

Contrasta la información bibliográfica de tu introducción con tus observaciones, incluye información relacionada con lo mencionado en la i

VII. FUENTES DE INFORMACIÓN.

Benjamin m. Maxime. 1984. Manual de Patología Clínica en Veterinaria. 1984. Ed. Limusa.

Bush. B. M. 1999. Interpretación de los Análisis de Laboratorio para Clínicos de Pequeñas Especies. Ed. Harcourt.

Bush. B. M. 1982. Manual del laboratorio veterinario de análisis clínicos.

Coles H. Embert. 1989. Diagnóstico y Patología en Veterinaria. 4ª. Ed. Interamericana/Mc Graw-Hill

Gregg L. Voigt. 2003. Conceptos y Técnicas Hematológicas para técnicos veterinarios. Ed. Acribia.

PRÁCTICA 6. HEMOGRAMA. BIOMETRIA AUTOMATICA, MICROHEMATOCRITO Y PROTEINAS PLASMATICAS

I. INTRODUCCIÓN.

El hemograma es un estudio rutinario realizado para el diagnóstico clínico de algunas entidades patológicas o como medio de seguimiento de evolución de las mismas. Los datos que aporta de manera importante es la presencia de anemia o eritrocitosis, así como la evidencia de enfermedades inflamatorias y ocasionalmente alérgicas, así como también permite identificar agentes etiológicos (*Babesia spp.*). Y la medición de sólidos totales por refractometría. A continuación se describen las técnicas para obtener los distintos valores del hemograma.

Indexx laboratorios utiliza métodos científicos para diseñar el sistema QBC, de modo que es una valiosa herramienta hematológica que constituye a mejorar la medicina veterinaria, el sistema cuantifica doce importantes parámetros hematológicos e incluye notas especiales para indicar, por ejemplo si una anemia es de carácter regenerativa o no. La rapidez del análisis es especialmente importante para el estudio de la sangre, ya que su composición comienza a cambiar inmediatamente después de la recolección de la muestra

II. COMPETENCIAS A LOGRAR.

El estudiante desarrolla las habilidades necesarias para hacer un hemograma obteniendo el hematocrito, los índices eritrocitarios así como el diferencial, para clasificar las anemias o en su caso policitemias presentes en el paciente, procesos inflamatorios y/o infecciosos, para tomar decisiones terapéuticas sobre los pacientes

III. MATERIALES Y EQUIPOS.

1. Jeringa y aguja nuevas o BIEN, un tubo vacutainer con su soporte y un a aguja de tamaño apropiado (o una aguja de mariposa).
2. Un tubo para recolección de sangre que contenga EDTA tripotásico (k3) o sódico. Tubos ó capilares QBC® VetTube de IDEXX.
3. Equipo
QBC. Vet. Centrifuge.
QBC. Vet. Autoreader.
Impresora Hp-deskjet. 5650
4. Pipeteador
5. Estación de trabajo.
6. Toallas de papel absorbentes sin pelusa.

IV. PROCEDIMIENTO.

Paso 1

Abrir la pipeta girando el tambor en el sentido contrario de las agujas del reloj. Colocar la extremidad del tubo con las líneas verdes dentro del tambor hasta que haga tope. Bloquear en dicho sitio volviendo el tambor en el sentido de las agujas del reloj hasta que se produzca un clic.

IMPORTANTE: Mezclar 10 veces la muestra con anticoagulante EDTA, antes de quitar la tapa y aspirar en la pipeta.

Paso 2

Presionar el embolo de la pipeta. Introducir la extremidad del tubo impregnada con naranja de Acridina en el centro de la muestra con EDTA. Soltar el embolo suavemente. Verificar que la sangre alcanza la línea negra de 111 μ l.

Algunos tambores se abren girando hacia delante, y se bloquean volviéndolos hacia atrás.

Paso 3

Limpiar el exterior del tubo con gasa sin pelusa. Colocar la extremidad de, tubo en la tapa del platillo. Fijar el sistema haciendo girar la pipeta de una media vuelta. Levante la pipeta y verifique la seguridad del cierre. Repita con un tubo si se observan infiltraciones de la muestra.

Paso 4

Sostener la pipeta horizontalmente y destrabar el mecanismo girándolo en el sentido contrario a las agujas de reloj. Quitar el tubo suavemente.

Paso 5

Sosteniendo el tubo horizontalmente, hacerlo girar entre los dedos 10 veces para asegurarse que los reactivos se mezclan bien con la muestra.

Paso 6

Para insertar el flotador: sostener el tubo horizontalmente y deslizarlo sobre la punta del flotador. Mantener el tubo cerca de las líneas verdes para evitar la rotura del mismo. Levantar el tubo para desalojar el flotador de la ranura. Complementar la inserción mediante el contacto de la extremidad del tubo contra la parte trasera de la bandeja.

IMPORTANTE: no tocar el flotador.

Paso 7

Centrifugar durante 5 minutos. Asegúrese de equilibrar la centrifuga con otro tubo. **IMPORTANTE:** asegúrese de volver a colocar y atornillar la tapa de la centrifuga antes de comenzar.

Paso 8

Seleccionar las especies correctas en el programa de análisis.

Paso 9

Verificar que el tubo esté exento de sangre o de impresiones digitales. Abrir el analizador y colocar el tubo en el carro con el lado del tapón hacia afuera.

PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR EL MICROHEMATOCRITO

MATERIAL NECESARIO

Tubos capilares
Microcentrífuga
Plastilina o un encendedor
Sangre con EDTA o heparina.

Técnico.

1. Llenar un tubo capilar liso (75 mm x 1.0 mm), hasta 3/4 partes de su capacidad con sangre anticoagulada con EDTA o heparina, sosteniendo el tubo en una posición casi horizontal para facilitar el llenado.

Como una alternativa puede obtenerse sangre por punción capilar de la oreja, la uña o dedo utilizando tubos heparinizados.

2. Limpiar el exceso de sangre del exterior del capilar.

3. El extremo capilar que tiene el anillo coloreado debe sellarse con plastilina manteniendo el capilar en posición horizontal e introduciendo este extremo seco en la placa con el compuesto sellador en un ángulo de 90°, girar el capilar ligeramente y retirar la placa. El tapón formado debe tener menos de 4 mm de longitud.

También puede ser sellado acercándolo a la flama de un mechero (o encendedor en su defecto) teniendo cuidado de no calentar la sangre.

4. Colocar el capilar en la microcentrifuga con la parte sellada hacia la periferia. Identificar bien los tubos.

5. Fijar el cabezal de la centrífuga y cerrar la tapa.

6. Centrifugar durante 5 minutos entre 12.500 y 15.000 rpm. no usar el freno para detener la centrífuga.

7. Se retiran los tubos de la centrífuga y se lee el porcentaje de hematocrito o también conocido como PVC (packed cell volume). Utilizando la tabla para su lectura.



8. Se debe leer el nivel de eritrocitos centrifugados; no incluir la capa rica en leucocitos y plaquetas (buffy coat).

Valor de referencia

Perros adultos = 0.37 – 0.55 L/L (37 a 55%)

Cachorros perros y gatos = (4 a 6 semanas) 0.24 a 0.34 L/L (24 a 34%)

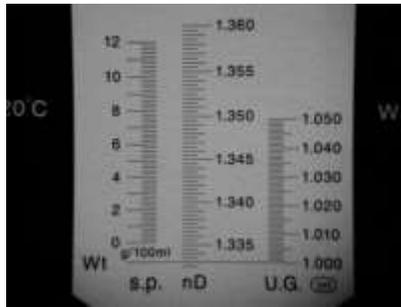
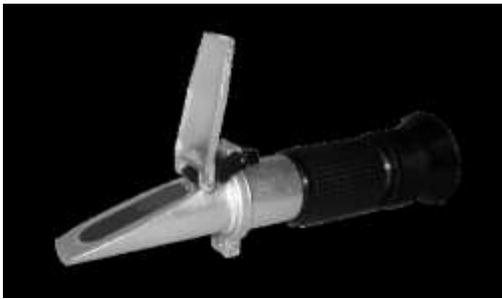
Gatos adultos = 0.30 a 0.45 (30 a 45%)

Estos valores son ligeramente más bajos en hembras, y dependen de la localidad donde se evalúen, por lo que se recomienda realizar tablas de referencia para valores hematológicos

PROTEINAS PLASMÁTICAS

MATERIAL NECESARIO

- Tubo capilar
- Sangre con EDTA
- Refractómetro
- Tornillo calibrador (Flecha blanca)



TÉCNICA

1. Se realiza la técnica para medir el microhematocrito mencionada anteriormente.
2. Una vez separados los componentes se revisa el color del plasma sobre un fondo blanco. Se pueden observar las coloraciones siguientes: amarillo pálido o paja, transparente, amarillo intenso, rosado o rojizo, blanco lechoso o turbio, rosa lechoso.
3. Posteriormente el tubo capilar se rompe por encima del Buffy coat.
4. Se depositan 1 o 2 gotas del plasma sobre el prisma del refractómetro por la parte contraria a la que se rompió el tubo capilar.
5. Se observa y se registran los niveles de proteínas plasmáticas en g/dl para multiplicarlos por 10 para obtener el valor en g/L.

Nota: los valores pueden estar falsamente elevados en hiperlipidemia, hemólisis y/o hiperbilirrubinemia.

Las proteínas plasmáticas y el hematocrito deben interpretarse en forma conjunta. Se tiene que calibrar antes de la lectura el refractómetro, aplicando una gota de solución buffer, ajustando el tornillo (flecha blanca), después de la lectura se realiza la limpieza con solución fisiológica y secar perfectamente el refractómetro

INDICES ERITROCITARIOS

Valor corpuscular medio.- Obtenidos los valores del número de eritrocitos, de la hemoglobina y del volumen globular, es posible calcular el volumen promedio de un eritrocito, además su concentración en hemoglobina. Estos valores son de importancia particular para precisar la clasificación morfológica de la anemia y también de ayuda para decidir el tratamiento y su continuación.

Volumen corpuscular medio (V. C. M.)Expresa el volumen promedio del eritrocito individual. Este valor se determina por división del volumen globular en 100 ml. de sangre, por el recuento de eritrocitos en millones por milímetro cúbico. El resultado se expresa en femtolitros (fl)

$$\text{V.C.M.} = \text{Ht} * 10 / \text{E (millones por microlitro)}$$

Hemoglobina corpuscular media. (H. C. M.) Cantidad de hemoglobina, por peso, en el eritrocito promedio. Este valor se determina por división de la hemoglobina en gramos, presente en 1000 ml. de sangre, por recuento de eritrocitos en millones por milímetro cúbico. El resultado se expresa en picogramos (pg)

H.C.M.= Hb * 10 / E (millones por microlitro)

Concentración media de hemoglobina corpuscular (C. M. H. C.) Concentración de hemoglobina en el eritrocito promedio o la proporción del peso de la hemoglobina y el volumen en el cual está contenido. Este cálculo se obtiene por división de la hemoglobina en gramos por 10, 000 ml. de sangre por el volumen de glóbulos rojos por 10 ml. de sangre.

C.M.H.C. = Hb*100 / Ht

Volumen globular medio (VGM)

RESULTADOS.

Los que arroje el equipo QBC, el Microhematocrito y el refractómetro.

VI. CONCLUSIONES.

Contrasta la información bibliográfica de tu introducción con tus observaciones, incluye información relacionada con lo mencionado en la introducción.

VII. FUENTES DE INFORMACIÓN.

Benjamin m. Maxime. 1984. Manual de Patología Clínica en Veterinaria. 1984. Ed. Limusa.

Bush. B. M. 1999. Interpretación de los Análisis de Laboratorio para Clínicos de Pequeñas Especies. Ed. Harcourt.

Bush. B. M. 1982. Manual del laboratorio veterinario de análisis clínicos.

Coles H. Embert. 1989. Diagnóstico y Patología en Veterinaria. 4ª. Ed. Interamericana/Mc Graw-Hill

Gregg L. Voigt. 2003. Conceptos y Técnicas Hematológicas para técnicos veterinarios. Ed. Acribia.

PRÁCTICA 7. PRUEBAS DE COAGULACIÓN. TIEMPO DE SANGRADO, RETRACCION DEL COAGULO Y PRUEBA DE FIBRINOGENO

I. INTRODUCCIÓN.

La evaluación de los tiempos de coagulación es una práctica ideal para conocer algún tipo de coagulopatía que podría presentarse en la práctica clínica. Aunque no son enfermedades comunes, si son situaciones que ponen en peligro la vida de los pacientes y deben ser reconocidas correctamente.

TIEMPO DE SANGRADO

Es una excelente prueba, útil y sensible de la función plaquetaria, puede realizarse en la mucosa bucal (tiempo de sangrado de la mucosa bucal TSMB) sobre el labio superior.

PRUEBA DE RETRACCION DEL COAGULO

Es una prueba sencilla, simple y fácil de realizar para evaluar la función Plaquetaria. La prueba se basa en que las plaquetas son contráctiles y con el tiempo fraccionan las bandas de fibrina y las juntan para formar un coágulo firme.

II. COMPETENCIAS A LOGRAR.

El alumno es competente en realizar las pruebas utilizadas para evaluar la cascada de la coagulación, además de interpretar correctamente los resultados proporcionados por el tiempo de sangrado la prueba de retracción del coagulo.
Y la prueba de fibrinogeno

III. MATERIALES Y EQUIPOS.

Tiempo de sangrado

Material:

Una lanceta

Una cuerda de 50 centímetros de largo

Un cronómetro

Una caja de papel filtro o papel higiénico

Material para prueba de retracción del coagulo

Un tubo de ensaye sin anticoagulante
Una muestra de sangre sin anticoagulante
Un baño María
Un cronómetro

IV. PROCEDIMIENTO.

Tiempo de Sangrado

El aumento de la presión venosa se produce colocando una cuerda en el Hocico (perro), misma que también sirve para mantener el labio evertido, a continuación se realiza un corte estándar, teniendo cuidado de no presionar la herida, ni manipularla. Con el papel filtro se absorbe la sangre que sale de la herida a intervalos de 15 segundos, sin tocar la incisión. Generalmente no se requiere anestesiarse al animal.

Interpretación:

El tiempo de sangrado en la mucosa oral no debe superar los 5 ó 6 minutos.

Prueba de Retracción del coagulo

El procedimiento consiste en colocar la sangre en un tubo sin anticoagulante, una vez coagulada la sangre esta se incuba en baño María a 37 °c

Interpretación:

La observación después de unos minutos debe mostrar cierto nivel de suero exprimido fuera del coágulo, por lo tanto visible en forma externa. A las 24 horas el coágulo sufre su máxima retracción.

PRUEBA DE FIBRINOGENO

1. El tiempo de trombina mide la cantidad de fibrinógeno funcional.
2. Método de Millar. Se calienta el plasma a 56° C en un tubo capilar para microhematocrito para precipitar el fibrinógeno: medición sencilla y bastante confiable del fibrinógeno.
 - a. Se colecta la sangre con EDTA y se pone en un tubo de microhematocrito, se sella uno de los extremos
 - b. Se hace girar por 5 minutos en una centrifuga de microhematocrito
 - c. Se coloca el tubo en un baño de agua a 56° C (\pm 1) por 3 minutos. Asegurando se la columna de plasma quede completamente bajo la superficie del agua.
 - d. El fibrinógeno precipitado queda empacado arriba de una capa amortiguada por

centrifugación, esto dura 3 minutos.

e. Una vez precipitado por temperatura y centrifugado se obtiene el suero y se hace la lectura en el refractómetro.

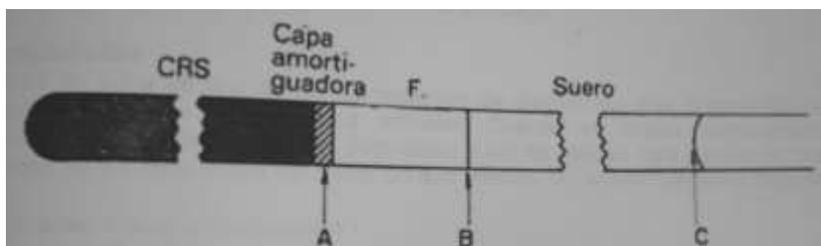


Figura 11. Lectura de la columna de plasma en el método de Millar

La diferencia de las proteínas plasmáticas observadas antes y después de la incubación es el valor del fibrinógeno en la muestra

V. RESULTADOS. Los que arrojen los equipos

VI. CONCLUSIONES.

Contrasta la información bibliográfica de tu introducción con tus observaciones, incluye información relacionada con lo mencionado en la introducción.

VII. FUENTES DE INFORMACIÓN.

Benjamin m. Maxime. 1984. Manual de Patología Clínica en Veterinaria. 1984. Ed. Limusa

Gregg L. Voigt. 2003. Conceptos y Técnicas Hematológicas para técnicos veterinarios. Ed. Acribia.

Lange. 2005. Hematología en la práctica clínica. Mc Graw-Hill.

Sodikoff. H. Charles. 2002. Pruebas Diagnósticas y el laboratorio en Pequeños animales, una guía para el lic de Laboratorio. 3ª. Ed. Harcourt: Madrid.

PRÁCTICA 8. PRUEBAS CRUZADAS

I. INTRODUCCIÓN.

La anemia es una entidad clínica sumamente común en la práctica diaria, en ocasiones esta anemia puede ser tan grave que los mecanismos compensatorios podrían verse superados y por tanto poner en riesgo la vida del paciente. La transfusión sanguínea es una técnica que se lleva a cabo siempre que existe un déficit de eritrocitos que transporten suficiente cantidad de oxígeno a los tejidos. Una de sus principales desventajas es la existencia de incompatibilidades que deben ser evaluadas previamente a la administración de sangre entre individuos, para hacer a esta práctica más segura.

No se debe transfundir a un paciente simplemente con base a un hematocrito (Hto), sino también tomar en cuenta la causa y si persiste la pérdida de sangre, si está respondiendo al tratamiento sintomático, etc. El funcionamiento renal, cardíaco y pulmonar también deben ser tomados en cuenta antes de realizar una transfusión. Cuando el Hto es menor a 0.30 L/L se encuentra deprimida la función ventricular, sin embargo, la extracción de oxígeno y la presión venosa central de O₂, permanecen normales hasta que se alcanza un Hto de 0.20 L/L (2, 3). El volumen sanguíneo circulante (plasma + eritrocitos) normal en perros es de 85 a 90 ml/kg., y en el gato es de 65-75 ml/kg (4).

II. COMPETENCIAS A LOGRAR.

El alumno es competente en desarrollar las habilidades necesarias para identificar las posibles incompatibilidades sanguíneas entre individuos de la misma especie, antes de realizar la transfusión sanguínea.

III. MATERIALES Y EQUIPOS.

Mililitros de sangre con EDTA de cada paciente (donador y receptor).

Solución salina

Microscopio clínico

Centrífuga clínica

Laminillas

Cubreobjetos

Pipetas automáticas 20-200 µL

Pipetas pasteur

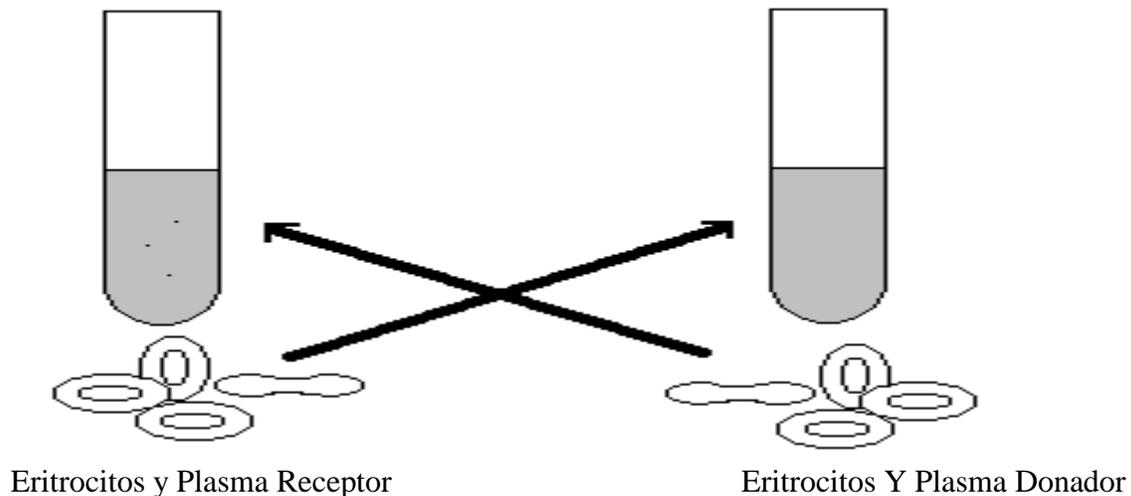
IV. PROCEDIMIENTO.

Técnica

Procedimiento para las pruebas cruzadas

1. Se deben extraer al menos 2 mililitros de sangre con EDTA de cada paciente (donador y receptor).
2. Se centrifugan las muestras a 3500 r.p.m. durante un minuto, a partir de aquí se separa el plasma.
3. Se realiza un lavado con solución salina de los eritrocitos, se homogenizan, se vuelve a centrifugar y se elimina el sobrenadante, esta acción se repite tres veces.
4. Del concentrado de eritrocitos de cada paciente se obtienen 20 μL de eritrocitos se mezclan con 980 μL de solución salina (Eritrocitos al 2%). De ambos el receptor y el donador.
5. Prueba cruzada MAYOR Se agregan 150 μL de eritrocitos del donador (solución al 2%) a 150 μL del plasma del receptor.
6. Prueba cruzada MENOR
Se agregan 150 μL de solución de eritrocitos (solución al 2%) del receptor a 150 μL de plasma del donador
7. Prueba CONTROL Se agregan 150 μL de eritrocitos del donador a 150 μL de plasma del donador.

Figura



8. Se incuban las tres preparaciones a 25° C durante 30 minutos.
9. Evaluar la presencia de hemólisis o aglutinación, tanto macro como microscópicamente en las tres pruebas. Colocar en un portaobjetos 10 μL de cada reacción y cubreobjetos encima.

INTERPRETACIÓN

La aglutinación o hemólisis indica un resultado de incompatibilidad. El desarrollo de alguno de estos fenómenos es indicativo de la presencia de anticuerpos contra uno o más de los antígenos de superficie de los eritrocitos, tanto del donador como del receptor, por lo que se corre un alto riesgo de desarrollo de reacciones adversas post-tranfusionales.

V. RESULTADOS.

La aglutinación o hemólisis indica un resultado de incompatibilidad. El desarrollo de alguno de estos fenómenos es indicativo de la presencia de anticuerpos contra uno o más de los antígenos de superficie de los eritrocitos, tanto del donador como del receptor, por lo que se corre un alto riesgo de desarrollo de reacciones adversas post-tranfusionales.

VI. CONCLUSIONES.

Contrasta la información bibliográfica de tu introducción con tus observaciones, incluye información relacionada con lo mencionado en la introducción.

VII. FUENTES DE INFORMACIÓN.

Benjamin m. Maxime. 1984. Manual de Patología Clínica en Veterinaria. 1984. Ed. Limusa.

Bush. B. M. 1999. Interpretación de los Análisis de Laboratorio para Clínicos de Pequeñas Especies. Ed. Harcourt.

Bush. B. M. 1982. Manual del laboratorio veterinario de análisis clínicos.

Di Pascuale, Stefania, Borbolla Escoboza José R. 2005. Manual de medicina transfusional. Mc Graw-Hill.

PRÁCTICA 9. TRANSFUCION SANGUINEA

I. INTRODUCCIÓN.

La transfusión sanguínea es importante en medicina veterinaria, usándose principalmente en las alteraciones hematológicas graves que aparecen tras traumatismos intensos o cirugía, y en las anemias. La principal limitación para la realización de una transfusión es la existencia de grupos sanguíneos diferentes en los individuos. Se denominan *grupos sanguíneos* a los antígenos que se expresan sobre la membrana de los hematíes, siendo los mismos específicos de especie, y *aloanticuerpos* a los anticuerpos dirigidos contra antígenos presentes en otros individuos de la misma especie animal. Cuando en el plasma de un individuo se observa la presencia de aloanticuerpos anti-antígenos eritrocitarios sin haber existido sensibilización previa (p.e. transfusión sanguínea anterior), se habla de aloanticuerpos naturales.

II. COMPETENCIAS A LOGRAR.

El alumno es competente en el manejo de una transfusión sanguínea y saber el momento necesario de realizarla.

III. MATERIALES Y EQUIPOS.

Bolsa para transfundir

Tijeras.

Torundas.

Alcohol

Overol

Botas

Cuerdas o mecate

Paciente receptor

Paciente Donante.

IV. PROCEDIMIENTO.

- 1.- Se realiza en ganado bovino (Se puede realizar en otras Especies).
- 2.-El paciente se sujeta de tal manera que quede inmovilizado para mayor facilidad en el manejo.
- 3.- Se localiza la vena yugular, se limpia perfectamente con alcohol y se introduce la aguja que trae la bolsa receptora.
- 4.- En un tiempo no mayor de 15 min. La bolsa receptora estará con la sangre suficiente para pasarla al paciente receptor
- 5.- EL paciente receptor tiene que estar en este momento ya inmovilizado para pasarle la sangre fresca.

Nota: Previamente los animales donantes y receptores han sido evaluados con pruebas de laboratorio (hto, hb, , prueba de brucela) en el caso de bovinos , caprinos y ovinos.

Se utiliza la siguiente fórmula para calcular los mL. Que necesita el paciente.

$$(Ht\ de\ ceado - Ht\ receptor)$$

mL de sangre: K x Peso Receptor en Kg x-----

$$(Hto\ donador)$$

K : 90

V. RESULTADOS.

Evidencias de la práctica con imágenes.

VI. CONCLUSIONES.

Contrasta la información bibliográfica de tu introducción con tus observaciones, incluye información relacionada con lo mencionado en la introducción.

VII. FUENTES DE INFORMACIÓN.

Benjamin m. Maxime. 1984. Manual de Patología Clínica en Veterinaria. 1984. Ed. Limusa.

Bush. B. M. 1999. Interpretación de los Análisis de Laboratorio para Clínicos de Pequeñas Especies. Ed. Harcourt.

Bush. B. M. 1982. Manual del laboratorio veterinario de análisis clínicos.

Di Pascuale, Stefania, Borbolla Escoboza José R. 2005. Manual de medicina transfusional. Mc Graw-Hill.

PRÁCTICA. 10 PRUEBAS ESPECÍFICAS PARA EVALUAR HÍGADO

I. INTRODUCCIÓN.

ALT. (Alanina Aminotrasferasa)

Esta enzima cataliza la transferencia de un grupo a-amino de la alanina al ácido acetoglutárico. La enzima se encuentra en el citoplasma de todas las células y existe una relación lineal entre la GPT hepática y el peso del animal. Siendo este el caso la determinación de GPT es casi específica del hígado del perro y el gato, mientras que es de escaso o de ningún valor en las enfermedades de bovinos y equinos. Se ha encontrada muy elevada en la necrosis hepática. Es una enzima muy estable, y en estado de congelación se conserva largo tiempo. La ictericia no estorba la determinación de la enzima, pero debe evitarse la hemólisis.

Las enfermedades hepáticas que producen niveles elevados de GPT comprenden neoplasias malignas, cirrosis y hepatitis, incluyendo la que se produce en el perro por el virus de la hepatitis canina infecciosa

UREA. Es un compuesto orgánico relativamente simple producido por los mamíferos en el hígado como producto final del catabolismo de las proteínas. Es una de las sustancias más difusibles en el cuerpo y se encuentra en todos los líquidos del cuerpo. Es relativamente atóxica, aunque en concentraciones altas desnaturaliza proteínas con la formación de productos tóxicos. La urea se elimina principalmente por los riñones, pero una porción de ella por la piel, sobre todo en los animales que sudan. Se ha observado que el nitrógeno ureico sanguíneo no se eleva en perros, salvo pocas excepciones, hasta que al menos el 75% del riñón funcional se ha destruido, y se aconseja hacer la determinación en todos los pacientes quirúrgicos de más de 5 años y en toda enfermedad en perros viejos antes de iniciar el tratamiento. La urea se aumenta en sangre por trastornos renales como la insuficiencia renal crónica y aguda; por obstrucción de las vías urinarias; excesiva destrucción de proteínas como en estados de fiebre, toxicidad o sepsis extensa. También se pueden aumentar los niveles de urea por una hemoconcentración debida generalmente a graves vómitos o diarreas; cuando existe alteración de la función cardíaca que reduce el flujo de sangre a través del riñón se ve aumentada la concentración de urea en sangre.

El descenso en los niveles de urea son raros, teóricamente pueden presentarse en asociación con graves enfermedades hepáticas o malnutrición de proteínas.

FOSFATASA ALCALINA (ALP)

Esta enzima hidroliza los fosfatos orgánicos en fosfato inorgánico y la fracción orgánica. Es una enzima muy estable y puede ser congelada con poca o ninguna pérdida de actividad se halla gran cantidad en el hígado, riñón, mucosa intestinal y hueso. En la mayoría de los animales, quizá con excepción del gato se elimina en su forma natural por el hígado por lo tanto cualquier obstrucción al flujo de la bilis causa aumento de la enzima en el suero. El problema es determinar la fuente de esta elevación cuando no es patente la enfermedad hepática. Se producen elevaciones de la enzima en el suero, en enfermedades del bazo, hígado, riñón, mucosa intestinal o hueso. En la obstrucción biliar se eleva notablemente, las neoplasias óseas malignas causan a veces niveles elevados. También se puede elevar la ALP por una mayor actividad de los osteoclastos durante el crecimiento

del esqueleto, por enfermedades óseas degenerativas en animales adultos, raquitismo, osteomalacia y en osteosarcoma. Durante interferencias con la excreción hepática, debida a una destrucción de las células hepáticas o a una destrucción del conducto biliar..

II. COMPETENCIAS A LOGRAR.

El alumno es competente en interpretar correctamente estas pruebas (ALT, UREA y FOSFATASA ALCALINA) para llegar a un diagnóstico definitivo del problema

III. MATERIALES Y EQUIPOS.

Kit de ALT. Urea y fosfatasa alcalina
Celdillas
Puntillas.
Espectrofotometro 6305 Jenway

2 mililitros de sangre con EDTA o suero de distintas especies domésticas

Tubos de reacción de 3 ml

Pipetas automáticas con volumen variable

IV. PROCEDIMIENTO.

ALT .-Metodo. Alanina aminotransferasa

PRINCIPIO.

La alanina aminotransferasa cataliza la transferencia del grupo amino de la alanina al 2-oxoglutarato formando piruvato y glutamato la concentración se determina empleando la reacción acoplada de la lactato deshidrogenasa.

MUESTRA.

Suero recogido mediante procedimiento estandar.

La alanina aminotransferasa es estable hasta por 7 días a 2-8 °c

EQUIPO.

Espectrofotometro 6305.
Seldillas

REACTIVOS.

Reactivo de trabajo –Vaciar el contenido del frasco B en el frasco A.

PROCEDIMIENTO

- 1.-Precalenta el reactivo de trabajo y el instrumento a temperatura de reacción
- 2- Pipeter en una celdilla.

Tem de reacción	37 °C	30 °C
Reactivo de trabajo	1,0µl	1,0 MI
Muestra	50 µl	100 µl

3.-Mezclar e insertar la cubeta en el espectrofotómetro. Poner el cronometro en marcha.

4.- Pasado un minuto, anotar la absorbancia inicial y efectuar nuevas lecturas cada minuto durante tres.

5.-Calcular el incremento de la absorbancia por minuto promedio

V. RESULTADOS.

La concentración de la Alanina aminotransferasa en la muestra se calcula a partir de la siguiente formula.

	37 °C	30° C
Concentración A/Min.	X 3333 =U/L	X 1746 =U/L

UREA.

PRINCIPIO.

La Urea presente en la muestra origina reacciones que dan origen un indofenol coloreado que se cuantifica espectrofometricamente

MUESTRA.

Suero, plasma u orina recogido mediante procedimiento estandar.

EQUIPO.

Espectrofotometro 6305. Para lecturas a 600 nm.

Seldillas

Baño de agua a 37° C

REACTIVOS.

Reactivo B y Patron S listos para usarse.

Reactvo A . Vaciar el contenido de un vial de reactivo A2 en un frasco de reactivo A1

PROCEDIMIENTO

1.-Atemperar los reactivos a temperatura ambiente.

2.-Pipeter en tubos de ensayo.

	Blanco	Patrón	Muestra
Patro. urea		10µl	
Muestra-			10µl
Reactivo A	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL

3.-Agitar bien e Incubar los tubos durante 10 min a temperatura ambiente (16-25 grados) o 37 grados durante 5.

4.- Pipetear.

Reactivo B	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL
------------	--------	--------	--------

5.- Agitar bien e Incubar los tubos durante 10 min a temperatura ambiente (16-25 grados) o durante o duo) o 37 grados durante 5

6.-Leer la absorancia (A) del Patrón y de la muestra a 600 nm frente al blanco. El color es estable durante al menos 2 horas

V. RESULTADOS.

La concentración de la Urea en la muestra se calcula a partir de la siguiente formula.

Suero y plasma.

A muestra. 50 = mg/dL. Urea.
_____ X 23.3= mmol/dL Bun
 8,3 = mmol/ L urea.

A Patrón.

VI. CONCLUSIONES.

Contrasta la información bibliográfica de tu introducción con tus observaciones, incluye información relacionada con lo mencionado en la introducción.

FOSFATASA ALCALINA

MÉTODO.

Colorimétrico.

PRINCIPIO.

4-nitrofenilfosfato + AMP(amino-metil-propanol)_____AMP -fosfato + 4-nitrofenol.

MUESTRA.

Suero, plasma u orina recogido mediante procedimiento estandar.

La fosfatasa alcalina en suero o plasma es 7 días a 2-8 °c Puede utilizarse heparina como anticoagulante estable.

CONDICIONES.

El animal debe tener un “ayuno” mínimo de 8 horas.

EQUIPO.

Espectrofotometro 6305. Para lecturas a 405 nm.

Seldillas

REACTIVOS.

Vaciar el contenido del frasco B en el frasco A agitar suavemente.

PROCEDIMIENTO.

1.-Precalentar el reactivo de trabajo y el instrumentó a la temperatura de reacción .

2-Pipeter en una celdilla.

Reactivo de trabajo	1.0 mL
---------------------	--------

Muestra-	20µl
----------	------

3.- Mezclar e insertar la muestra en el fotómetro. Poner el cronometro en marcha.

4.- Anotar la absorbancia inicial y efectuar nuevas lecturas cada minuto durante tres minutos.

5.- Calcular el incremento de la absorbancia por minuto Promedio

V. RESULTADOS.

La concentración de FA en la muestra se calcula a partir de los siguientes factores.
Absorbancia /Min X 2764 U/L

VI. CONCLUSIONES.

Contrasta la información bibliográfica de tu introducción con tus observaciones, incluye información relacionada con lo mencionado en la introducción.

VII. FUENTES DE INFORMACIÓN.

Técnica del KIT (fostasa Alcalina).

De la Marca BioSystems

Técnica del KIT (Urea / Bun).

De la Marca BioSystems

Bush. B. M. 1999. Interpretación de los Análisis de Laboratorio para Clínicos de Pequeñas Especies. Ed. Harcourt.

Bush. B. M. 1982. Manual del laboratorio veterinario de análisis clínicos

Sodikoff. H. Charles. 2002. Pruebas Diagnósticas y el laboratorio en Pequeños animales, una guía para el lic de Laboratorio. 3ª. Ed. Harcourt: Madrid

Bush. B. M. 1999. Interpretación de los Análisis de Laboratorio para Clínicos de Pequeñas Especies. Ed. Harcourt.

Bush. B. M. 1999. Interpretación de los Análisis de Laboratorio para Clínicos de Pequeñas Especies. Ed. Harcourt

PRÁCTICA. 11 URINANÁLISIS O EXAMEN GENERAL DE ORINA

I. INTRODUCCIÓN.

El Urianálisis como herramienta diagnóstica, permite evaluar distintos órganos y sistemas tales Como la sangre, el páncreas endocrino, el hígado y el sistema inmunológico, así como algunas enfermedades neoplásicas y musculares. Lo anteriormente descrito indica que se deben interpretar correctamente los resultados para poder tomar decisiones diagnósticas y/o terapéuticas.

II. COMPETENCIAS A LOGRAR.

El alumno es competente en desarrollar las habilidades necesarias para evaluar las alteraciones presentes en el Urianálisis que le permita diferenciar los orígenes de estas.

III. MATERIALES Y EQUIPOS.

5 mililitros de orina.
Tubos de ensayo
Microscopio
Centrífuga (1500-3000 rpm)
Tiras reactivas de orina

IV. PROCEDIMIENTO.

El examen de la orina está conformado por tres partes, un examen físico, uno químico y uno microscópico, que se realizan en ese orden. El procedimiento se procesa de la obtención de 5 mililitros de orina por diferentes técnicas como son:

Micción espontánea.

Ventajas
Fácil.
No traumático.

Desventajas
Falta de cooperación del animal.
Necesidad de evitar el residuo del final de la micción.
Riesgo de hematuria y rotura de la vejiga con la presión manual.
Volumen variable.
Riesgo de contaminación fecal/muestra no adecuada para cultivo.

Cistocentesis.

Ventajas
Rápida.
Aséptica.
Sin contaminación uretral.

Fácil de realizar cuando la vejiga esta moderadamente distendida el paciente adecuadamente sujeto.

Riesgo mínimo de hematuria e iatrogenia.

Desventajas

Experiencia

Contraindicado cuando hay Trombocitopenia o la vejiga esta hiperdistendida (obstrucción del tracto urinario inferior) ó no está suficientemente llena.

Cateterización.

Ventajas

Sin riesgo de contaminación

Desventajas

Experiencia

Riesgo de infección e iatrogenia, hematuria por lesión en la mucosa

Costo del equipo y del catéter desechable.

Una vez obtenida la muestra esta debe ser vertida en un tubo de cristal nuevo o limpio que no contenga ningún tipo de aditivo. En este tubo es donde se observarán las distintas pruebas a realizar en la orina.

Nota : Se realizara la prueba de urianalisis por medio de la técnica de Cistocentesis guiada por ultrasonido.

EXAMEN FÍSICO

Evaluar las características organolépticas de la orina.

1. **Color.-** suele ser amarilla, pálido o ámbar, depende de la concentración urinaria y se debe interpretar junto con la densidad urinaria. El color se determinan al observar la orina en el tubo de ensayo.

1. Amarilla (clara, pálida, oscura)

2. Incolora

3. Café-amarillenta o rojiza

4. Verde

5. Rojo

6. Azul

7. Lechoso

2. **Olor.-** (este paso suele evitarse) pero se determina por medio del olfato indirectamente al verter la muestra de orina al tubo, debe hacerse con distancia y puede reportarse:

1. Normal o característico

2. Amoniacal

3. Dulce
4. Putrefacto
5. A fármacos

3. **Aspecto.-** hay que comparar el aspecto de la orina fresca en los perros y gatos normales, la cual suele ser transparente durante la micción; puede presentar cierto grado de turbidez debido a factores como cristales, células, lípidos, etc. Puede reportarse:

1. Transparente
2. Ligeramente turbia
3. Turbia
4. Muy turbia

4. **Densidad urinaria.**

EXAMEN QUÍMICO.

Técnica manual:

Realizar el examen químico dentro de la primera hora de recolectada la orina.

La muestra de orina deberá depositarla en un tubo de ensayo, lo suficiente para poder introducir la tira reactiva de orina y esta se humedezca de manera correcta y completa;

Retirla inmediatamente para evitar que se disuelvan los reactivos.

Al momento de sacar la tira deslice el borde de la tira contra el canto del recipiente para eliminar el exceso de orina.

Mantenga la tira en una posición horizontal para prevenir posibles mezclas de los reactivos y/o contaminar las manos con orina.

Leer visualmente comparando las áreas reactivas con la correspondiente escala de color de la carta adherida al frasco a los tiempos especificados más adelante.

Mantenga la tira cerca de los bloques de color y compare cuidadosamente

Evitar tocar la carta de color con la tira para que no se deteriore la carta.

EXAMEN MICROSCÓPICO

Para interpretar el sedimento urinario deberá de ser de manera inmediata o bien centrifugar la muestra y recoger el sedimento para comenzar a examinarlo. Si se demora para hacer la inspección las células pueden lisarse, cambiar el pH y la precipitación de cristales sin trascendencia.

Sedimento centrifugado.

En un tubo de ensayo añadir aproximadamente 5 ml de orina en un tubo de ensayo limpio y utilizar otro tubo de ensayo que contenga la misma cantidad (para equilibrar la centrifuga) y centrifugar de 1,500 a 2, 000 rpm durante 3 minutos.

Una vez centrifugado reportar la cantidad de sedimento como escaso, moderado o abundante.

Se deberá decantar la muestra y con una pipeta de Pasteur mezclar el sedimento y recolectar aproximadamente 0.5-1 ml del sobrenadante.

Sobre un portaobjetos limpio colocar una gota de la orina y colocar encima un cubreobjetos. Examinar la muestra primero con un objetivo de 10X y posterior con 40X.

Los hallazgos pueden reportarse como cantidad promedio que se observa por campo o escasos, varios y abundantes

Interpretación u Observaciones.

Examen Químico.

Los resultados se deben reportar de manera cualitativa (como 1+, 2+, 3+, etc.) ya que la determinación del color es apreciativa del técnico y la concentración depende de la gravedad específica o densidad urinaria).

Sólo deberán colocarse concentraciones aproximadas cuando se utilicen aparatos ópticos para la lectura de las tiras reactivas.

Examen Microscópico.

La muestra se observa en un objetivo 10X, para encontrar el plano donde hay sedimento, determinar la cantidad del sedimento y encontrar elementos de mayor tamaño como cilindros y agregados celulares, se debe examinar el área completa bajo el cubreobjetos debido a que los cilindros tienden a flotar en el extremo de cubreobjetos. Estos se reportan como el número medio observado en el objetivo poco aumentado.

Para detectar la presencia de bacterias e identificar algunos cristales y diferenciar tipos celulares es necesario el objetivo 40X. las células epiteliales, los eritrocitos y leucocitos se reportan como número medio observado por un objetivo de muchos aumentos.

Las bacterias se registran como escasas, moderas o abundantes y su morfología (coco, bacilo, filamento, etc)

V. RESULTADOS.

Los que se obtenga de la muestra problema

VI. CONCLUSIONES.

Contrasta la información bibliográfica de tu introducción con tus observaciones, incluye información relacionada con lo mencionado en la introducción.

VII. FUENTES DE INFORMACIÓN.

Bush. B. M. 1999. Interpretación de los Análisis de Laboratorio para Clínicos de Pequeñas Especies. Ed. Harcourt.

Bush. B. M. 1982. Manual del laboratorio veterinario de análisis clínicos

Sodikoff. H. Charles. 2002. Pruebas Diagnósticas y el laboratorio en Pequeños animales, una guía para el lic de Laboratorio. 3ª. Ed. Harcourt: Madrid

BENJAMIN, M. Manual de Patología Clínica en Veterinaria. (1991). Ed. Limusa., México.

COLES, H.: Diagnóstico y Patología en Veterinaria (1989). Ed. Inteeramericana. México.

PRÁCTICA 12. DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS POR AGLUTINACIÓN EN PLACA

INTRODUCCIÓN.

La brucelosis, también llamada fiebre malta o fiebre ondulante, es una enfermedad bacteriana que ataca varias especies de mamíferos dentro de los cual se encuentra el ser humano. También infecta otros mamíferos dentro de los cuales se encuentran algunos con alta relevancia económica como lo pueden ser los ganados bovino, equino, caprino, ovino, porcino y otras especies silvestres.

La prueba de rosa de bengala se emplea como tamiz que sumada a otras pruebas permite el diagnóstico definitivo. Esta prueba es un procedimiento cualitativo de ejecución y observación rápida de aglutinación hecha en una sola dilución evidenciando principalmente anticuerpos de tipo IgG.

COMPETENCIAS A LOGRAR.

Interpretación correcta de los resultados

Implementar adecuadamente la técnica

Actuar con responsabilidad en el cumplimiento de todas las actividades

MATERIAL Y EQUIPO.

- Bata
- Guantes
- Muestra (suero)
- Centrifuga
- Reactivo rosa de bengala
- Micropipeta
- Puntillas de 100µl
- Placa de vidrio
- Microscopio

PROCEDIMIENTO.

Centrifugar la muestra para obtener el suero

Colocar 30µl de suero sobre la placa de vidrio

Añadir 30µl del reactivo rosa de bengala sobre el suero

Agitar la placa con movimientos circulares durante 15 segundos

Verificar aglutinación con microscopio

RESULTADOS.

CONCLUSIONES.

FUENTES DE INFORMACIÓN.

- Valero, E.G. *et al.* Diagnóstico Veterinario 3^a.ed. Requisitos, Proceso, Interpretación, Ventajas y Desventajas de Técnicas Diagnósticas. 2000. Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios A.C.
- Trigo, F. J. y Valero, E.G. Patología General Veterinaria. Tercera edición, 2002. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Ciudad Universitaria, México, D.F.
- Rodríguez T. *et al.* (2001). Manual de Brucelosis. Castilla León España