



**REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
CÁTEDRA DE HEMATOLOGIA
MÉRIDA ESTADO MÉRIDA**



**EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN EN UN MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN
MANUAL DE LEUCOCITOS APLICADO EN MUESTRAS PROVENIENTES
DE ESTUDIANTES DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ULA 2015-2016.**

Trabajo de Grado Presentado como Requisito para optar al Título de
Licenciado en Bioanálisis

Autora: Lucero Salas Lilibeth Carolina

C.I: 20.790.553

Tutora: Prof. Castro Amaya Aribert

Mérida, Noviembre de 2017



**REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
CÁTEDRA DE HEMATOLOGIA
MÉRIDA ESTADO MÉRIDA**



**EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN EN UN MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN
MANUAL DE LEUCOCITOS APLICADO EN MUESTRAS PROVENIENTES
DE ESTUDIANTES DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ULA 2015-2016.**

Autora: Lucero Salas Lilibeth Carolina

C.I: 20.790.553

Tutora: Prof. Castro Amaya Aribert

Mérida, Noviembre de 2017

DEDICATORIA

.....A mi Dios

.....A mi madre

.....A mi hijo

.....A mi abuela

.....A mis tíos

.....A mis hermanos

.....A mis primos

.....A mis amistades

A la ilustre Universidad de los Andes.

www.bdigital.ula.ve

Lilibeth C. Lucero S.

AGRADECIMENTOS

A mi Dios: pues gracias a él culmine una meta más de mi vida, me ilumino, guio y me dio las fuerzas necesarias para derrotar toda barrera.

A mi madre: gracias a ti por darme la vida, por luchar para yo poder conseguir esta meta, por ser la mejor madre del mundo te amo.

A mi hijo: gracias a ti, pues eres mi gran motor, el que ahora y siempre iluminas mi vida y todas las metas que se presenten.

A mi abuela: mi segunda madre incondicional, gracias por siempre apoyarme y aconsejarme, no te cambiaría por nada ni naden.

A mis hermanos: gracias por siempre apoyarme, y a ti Juan S. que aunque no estés conmigo sé que desde el cielo me cuidas y me guías.

A mis tíos: gracias porque ustedes fueron mi ejemplo a seguir.

A mis primos: ustedes que a pesar de la distancia siempre estaban para mí muchas gracias.

A mis amistades: gracias por siempre estar allí.

A la ilustre Universidad de los Andes: pues fue mi base para poder crecer como persona y profesional.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	vii
RESUMEN	viii
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I EL PROBLEMA	3
Planteamiento del Problema.....	3
Objetivos de la Investigación.....	5
Objetivo General.....	5
Objetivos Específicos.....	5
Justificación e Importancia.....	5
Alcances y Limitaciones de la Investigación.....	6
CAPÍTULO II MARCO TEORICO	7
Trabajos Previos.....	7
Antecedentes Históricos.....	9
Bases Teóricas.....	13
El método analítico.....	13
La Sangre.....	14
Funciones de la Sangre.....	15
Hematopoyesis.....	15
Cámara de Neubauer.....	17
Pipetas automáticas.....	18
Precisión.....	19
El coeficiente de variación (CV).....	20
Estudio de la precisión.....	20

Evaluación de la precisión de un laboratorio.....	21
Definición de Términos.....	21
Hipótesis.....	24
Sistema de Variables.....	25
Operacionalización de las Variables.....	26
CAPÍTULO III MARCO METODOLÓGICO.....	27
Enfoque de la Investigación.....	27
Tipo de Investigación.....	27
Diseño de la Investigación.....	28
Población.....	28
Muestra.....	28
Materiales.....	28
Procedimientos.....	29
Técnica para extracción y obtención de la muestra sanguínea.....	29
CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
Resultados.....	31
Discusión.....	36
CAPITULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIÓN	
Conclusiones.....	37
Recomendaciones.....	38
BIBLIOHEMEROGRAFÍA.....	39
ANEXOS.....	44
Anexo 1. Pipetas Automáticas.....	44
Anexo 2. Liquido de Türk.....	44
Anexo 3. Cámara de Neubauer.....	45
Anexo 4. Microscopio.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Componentes de la sangre.....	14
2	Función de la sangre.....	15
3	Hematopoyesis.....	17
4	Cámara de Neubauer.....	18
5	Pipeta Automática.....	19
6	Gráfico de Comparación del coeficiente de variación en leucocitos de individuos interindividuales.....	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Pág.
1	Operacionalización de la Variables.....	26
2	Media de Valores de leucocitos en estudiantes. Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA. Periodo 2015-2016.....	31
3	Comparación del coeficiente de variación en leucocitos intraindividual.....	34
4	Estadísticos descriptivos del coeficiente de variación en leucocitos intraindividual.....	35

REPUBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
CÁTEDRA DE HEMATOLOGIA
MÉRIDA ESTADO MÉRIDA

**EVALUACION DE LA PRESICION EN UN METODO DE CUANTIFICACIÓN
MANUAL DE LEUCOCITOS APLICADAS EN MUESTRAS PROVENIENTES
DE ESTUDIANTES DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANALISIS DE
LA FACULTAD DE BIOANALISIS ULA 2015-2016.**

Autor: Lucero Salas Lilibeth Carolina
Tutor: Aribert Castro Amaya
Mérida, Noviembre de 2017

RESUMEN

Los laboratorios clínicos, de acuerdo con los principios básicos de calidad, oportunidad y racionalidad, deben producir resultados confiables para asistir a los médicos en el diagnóstico y seguimiento de sus pacientes. Los glóbulos blancos o leucocitos son un conjunto heterogéneo de células sanguíneas que son los efectores celulares de la respuesta inmunitaria, interviniendo así en la defensa del organismo contra sustancias extrañas o agentes infecciosos. La metodología manual utilizada por excelencia a través de los años ha sido la técnica de la pipeta tipo Thoma para el conteo de leucocitos, que con el paso del tiempo los analistas las han sustituido por el uso de pipetas automáticas ya que son mucho más fáciles y rápidas de manipular; es por ello que el objetivo de la siguiente investigación fue evaluar la precisión en un método de cuantificación manual de leucocitos aplicadas en muestras provenientes de estudiantes de la facultad de Farmacia y Bioanálisis. El estudio fue de tipo correlacional y de campo. Se analizaron 30 muestras las cuales se les realizó un triplicado con la pipeta manual automática. Obtenidos los resultados se utilizó el coeficiente de variación como estadístico para determinar la precisión del método de cuantificación manual de leucocitos con pipetas automáticas por triplicado. La evaluación estadística de los datos se realizó con un nivel de confianza del 95%, en el programa estadístico SPSS versión 23 para Windows, obteniéndose los siguientes resultados: una variabilidad interindividual de un 30,44%, una variabilidad intraindividual que fluctuó entre 0,83% y 15,99% y un coeficiente de variación de 4,15%. Por lo cual podemos deducir con los resultados obtenidos, que la pipeta automática es un método preciso para la determinación de glóbulos blancos.

Palabras claves: Evaluación, precisión, cuantificación, leucocitos, pipetas automáticas.

INTRODUCCIÓN

Los glóbulos blancos o leucocitos son un conjunto heterogéneo de células sanguíneas que son los efectores celulares de la respuesta inmunitaria, interviniendo así en la defensa del organismo contra sustancias extrañas o agentes infecciosos. Se originan en la médula ósea y en el tejido linfático; por tanto, resulta de gran importancia determinar el número de leucocitos presentes en el organismo de una forma rápida y precisa (Freund, 2011; Arias 2000).

La metodología manual utilizada como referencia internacional para la determinación de estas células, ha sido la técnica de las pipetas tipo Thoma, Con el paso del tiempo los analistas, las han sustituido por el uso de pipetas automáticas o micropipetas. Sin embargo, esta práctica común en los laboratorios clínicos, carece de evidencias científicas, que puedan asegurar, que los resultados obtenidos con las pipetas automáticas sean igual de reproducibles y confiables como la utilización de las pipetas tipo Thoma (Navarro, 1999; Rodríguez, y col., 2006).

La pipetas automáticas o micropipetas son dispositivos empleados para succionar y transferir pequeños volúmenes de líquidos, funcionan por desplazamiento de aire, usualmente se compone de un cuerpo y una punta plástica que se desprende del cuerpo de la pipeta. De manera que son mucho más fáciles y rápidas de manipular (Navarro, 1999; Rodríguez, y col., 2006).

Ante la interrogante continua, sobre la utilización de las pipetas automáticas, en sustitución de la pipeta tipo Thoma, nace el objetivo de esta investigación, el cual es evaluar la precisión, es decir, expresar la concordancia entre una serie de mediciones obtenidas en múltiples pruebas de algunas muestras homogéneas bajo iguales condiciones preescritas describiendo la reproducibilidad de la medición, la cual no implica que se repita y obtener resultados aproximados entre el valor obtenido en la

medición y la cantidad realmente existente en el material examinado (Warren, 1975).

La precisión es una medida de reproducibilidad de un resultado. Si se mide una cantidad varias veces y los valores concuerdan mucho entre si se dice que la medida es precisa. Es determinada utilizando el coeficiente de variación (CV), el cual indica la magnitud de la dispersión con respecto a la media. Sin embargo, esta práctica en los laboratorios clínicos carece de evidencias científicas, que permitan asegurar, que los resultados obtenidos sean reproducibles y confiables. Dicha interrogante es lo que a planteado este trabajo de investigación, en donde evaluamos la precisión en un método de cuantificación manual de leucocitos aplicado en muestras provenientes de estudiantes de la facultad de Farmacia y Bioanálisis (Harry, 2007).

La siguiente investigación está estructurada en cinco capítulos, los cuales tendrán una diversidad de elementos, tales como:

Capítulo I: EL PROBLEMA, Planteamiento del Problema, Justificación e importancia de la Investigación, Objetivos de la Investigación, Alcances y Limitaciones de la Investigación.

Capítulo II: MARCO TEÓRICO, Trabajos Previos, Antecedentes Históricos, Bases Teóricas, Definición de Términos Básicos, Hipótesis, Sistema de Variables, Operacionalización de las Variables.

Capítulo III: MARCO METODOLÓGICO, Enfoque de la Investigación, Tipo de Investigación, Diseño de la Investigación, Población y Muestra, Materiales, Procedimientos o Metodología, sistema estadístico.

Capítulo IV: RESULTADOS Y DISCUSION.

Capítulo V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CAPITULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

Los laboratorios clínicos, de acuerdo con los principios básicos de calidad, oportunidad y racionalidad, deben producir resultados confiables para asistir a los médicos en el diagnóstico y seguimiento de sus pacientes. Los valores obtenidos en un laboratorio deben ser reproducibles y coherentes tanto al repetir una misma prueba en días distintos, como al comparar los resultados entre laboratorios (Rodríguez, 1997; Fink y Fernández, 1996).

En el área de Hematología para llevar a cabo el recuento de células sanguíneas, es necesario realizar diluciones con líquidos apropiados, que permitan la visualización de dicha células (eritrocitos, leucocitos y plaquetas). Se requieren diluciones de 1:20 para leucocitos, 1:100 para plaquetas y 1:200 para eritrocitos; las cuales pueden variar dependiendo del caso, pero en condiciones fisiológicas normales estas son las concentraciones adecuadas para su visualización.

En lo relativo a las cuentas de leucocitos, es necesario destruir por hemólisis el total de glóbulos rojos, así pudiendo visualizar los glóbulos blancos. El líquido de dilución apropiado para realizar esta función es el ácido acético glacial con un tinte de violeta de genciana, el cual permite colorear el núcleo de las células y hacer más fácil su reconocimiento, estos métodos de dilución pueden realizarse a través de métodos manuales (pipetas tipo Thoma/cámara de Neubauer) y equipos automatizados (Navarro, 1999).

En los últimos años la metodología manual, que tradicionalmente consistía en el llenado de las pipetas tipo Thoma, ha evolucionado con la utilización de micropipetas o pipetas automáticas de ensayo; estos instrumentos de laboratorio simplifican la extracción y distribución de una muestra en una pipeta ordinaria, utilizan medios mecánicos o automáticos para su desalojamiento (Leeson y col., 1990).

En la actualidad la mayoría de los laboratorios clínicos, cuentan con sistemas automatizados, proporcionando resultados confiables en menor cantidad de tiempo y reduciendo los errores humanos introducidos involuntariamente en las metodologías manuales. Sin embargo, estos equipos automáticos poseen limitaciones. El principal inconveniente de estos sistemas es el alto costo de los insumos (aproximadamente 3 veces el valor de los métodos manuales), lo que dificulta su implementación en países en vías de desarrollo. Otra dificultad, es que requieren de métodos o equipos de respaldo ante la eventualidad de fallas mecánicas que inhabiliten su uso, o ante la pérdida de sensibilidad de los mismos, situaciones que hacen necesario recurrir a los métodos convencionales antes descritos (Brambila y col., 2003; Santillán y col., 2009; García, 2002).

En cualquiera de las situaciones antes expuestas, para realizar el recuento manual de manera adecuada de los glóbulos blancos, no solo se requiere del instrumental de laboratorio adecuado, así como agilidad y destreza del analista, sino que además se precisa de la simplificación de las técnicas de cuantificación, que permitan proporcionar resultados confiables a los pacientes y faciliten el trabajo en el laboratorio clínico (Navarro, 1999).

Por consiguiente, los laboratorios clínicos, tanto públicos como privados están en la obligación de prestar servicios de calidad al colectivo, haciendo necesario evaluar la precisión de las pipetas automáticas durante la determinación de glóbulos blancos, para establecer si los resultados son o no significativos.

Tomando en consideración lo anteriormente planteado, se formula el problema mediante la siguiente interrogante:

¿Poseen precisión las pipetas automáticas para la cuantificación manual de leucocitos?

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Evaluar la precisión en un método de cuantificación manual de leucocitos aplicadas en muestras provenientes de estudiantes.

Objetivos Específicos

- Obtener los valores de glóbulos blancos con pipetas automáticas.
- Realizar las determinaciones con pipetas automáticas por triplicado.
- Evaluar la precisión de los resultados.

Justificación e Importancia

En la actualidad los laboratorios clínicos, cuentan con equipos automatizados para la cuantificación de glóbulos blancos, los cuales a través de calibraciones oportunas de dichos instrumentos y controles de calidad adecuados, son precisos y confiables. Sin embargo, las valoraciones con técnicas manuales siguen utilizándose con frecuencia en los laboratorios bioanalíticos, útiles para corroborar un resultado obtenido por equipo automatizado, en condiciones clínicas que lo requieren o porque simplemente es el único medio de determinación.

La metodología manual estandarizada y aprobada por los manuales oficiales para determinar glóbulos blancos, es la técnica de pipetas según Thoma, las cuales están constituidas por un bulbo y tienen una marca de enrase definida; al pasar del tiempo los analistas las han sustituido por el uso de pipetas automáticas o micropipetas, las cuales son dispositivos que permiten transferir pequeños volúmenes de muestra, por lo tanto son mucho más prácticas y rápidas de utilizar.

En la siguiente investigación se pretendió facilitar los conocimientos y las herramientas necesarias, para que los laboratorios tanto públicos como privados, utilicen las técnicas más rápidas y precisas para la cuantificación de leucocitos, brindando resultados más confiables para asistir a los médicos y contribuir al fomento de la salud colectiva.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

La presente investigación evaluó una técnica manual, para la cuantificación de los glóbulos blancos o leucocitos, determinando la existencia o no de precisión.

Durante el desarrollo de la investigación se evidenciaron los siguientes alcances:

- ✓ La disposición del laboratorio de Hematología, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis ULA, donde se recolectaron y procesaron las muestras de sangre.
- ✓ La colaboración de los estudiantes del área de Hematología ULA, quienes proporcionaron la sangre recolectada por ellos mismos, durante las prácticas en dicha cátedra.

CAPÍTULO II

MARCO TEORICO

Trabajos Previos

Rodríguez y col., (2001), publicaron un artículo el cual se denominó: Confiabilidad del Método de Jaffé modificado por Laboratorios Heiga para la determinación automatizada de la Creatinina. Para evaluar la confiabilidad de dicho método, se determinó la precisión, exactitud, sensibilidad y linealidad, utilizando el reactivo Creatinina 520 en el autoanalizador IMPACT 400E. La precisión y exactitud fueron evaluadas con el CV y DEO (respectivamente) resultantes de la determinación de creatinina en 30 alícuotas de sueros controles de concentración inferior, dentro y superior a los rangos de referencia del método. Similarmente, se procedió con estándares acuosos de baja, media y alta concentración para la evaluación de la sensibilidad y linealidad, las cuales fueron verificadas aplicando la T de student entre los estándares de concentración baja más cercana y la correlación lineal entre VE y Vo, respectivamente. Se obtuvo exactitud y precisión en los controles, sensibilidad y linealidad a partir de 0,2 mg/dL (límite de detección) presentándose diferencias estadísticamente significativas ($p=0,05$) entre los estándares de baja concentración. Se concluyó que el método es confiable; por lo que, el reactivo creatinina 520 de Laboratorios HEIGA puede ser recomendado para la determinación directa automatizada del analito en baja, normal y alta concentración.

De igual manera, Escalona, (2014). Desarrollo un artículo titulado: Desempeño analítico en la determinación de colesterol y triglicéridos en laboratorios clínicos de la ciudad de Maracaibo, Venezuela. Con el propósito de evaluar el desempeño analítico en la determinación de colesterol total

(CT) y triglicéridos (TG) en laboratorios clínicos de la ciudad de Maracaibo, Venezuela, aplicando una evaluación externa de la calidad (EEC), se distribuyeron seis controles comerciales normal (CN) y seis anormal (CA) a trece laboratorios, utilizando equipos automatizados para dichas mediciones. Para valorar el desempeño se determinó precisión inter e intralaboratorio mediante el coeficiente de variación (CV) y exactitud por medio del cálculo del desvío relativo porcentual (DRP). La meta analítica utilizada para la valoración interlaboratorio fue Aspen (CV para CT hasta 8,3% y TG hasta 12,5%) y para la intralaboratorio los criterios de six sigma: 2,8% para CT y 4,2% para TG. En la precisión interlaboratorio el CV obtenido fue de 7,88% y 9,35% para CT y TG respectivamente, e intralaboratorio el CV para CT fue de 4,87% y para TG 5,84%. De los laboratorios evaluados solo el 15,38% para CT y el 46,15% para TG alcanzaron precisión intralaboratorio. El porcentaje de laboratorios con DRP aceptables en CT fue 73,08% y para TG 92,11%. La mayoría de los laboratorios no alcanzaron la meta analítica en la precisión intralaboratorio y la exactitud fue satisfactoria para ambas determinaciones y ambos controles. Se concluyó que es posible la transferibilidad de los resultados entre los laboratorios de la región para CT y TG, obteniéndose el mejor desempeño analítico para TG. También se evidenció fallas en el control de calidad interno siendo necesaria la implementación de programas de EEC en la región.

Por otra parte, Santillán y col., (2009) publicaron un artículo, el cual se denominó: Validación del método analítico del citómetro XE-2100, y comparación con el método convencional para las cuentas de leucocitos en líquidos corporales. El XE-2100 es un analizador con el principio de citometría de flujo fluorescente, el cual contiene un programa diseñado para las cuentas de células en líquidos corporales, el objetivo era determinar la precisión del XE-2100 con muestras clínicas y evaluar la concordancia y correlación para el conteo de leucocitos entre el analizador y el método convencional (manual). Donde la metodología utilizada fue la Precisión, se

utilizaron 6 muestras clínicas de líquido de diálisis peritoneal, de las cuales se realizaron 10 repeticiones de cada una por los métodos mencionados, como cualquier muestra de líquido corporal. Las cuentas de leucocitos se llevaron a cabo con el equipo XE-2100 y por el método convencional empleando para la dilución la pipeta automática, usando la cámara de Neubauer para la cuenta de los glóbulos blancos y un microscopio. Llegando a la conclusión de que el equipo puede ser utilizado con confianza para las cuentas de leucocitos en líquidos corporales.

Antecedentes Históricos

La estimación cuantitativa existió desde las culturas más antiguas con el conteo de objetos y la estimación aproximada de distancias, áreas, volúmenes, pesos e intervalos de tiempo y en forma más vaga con la referencia a velocidades, fuerzas, temperaturas, durezas y otras características de los objetos y procesos físicos. Lo notable es que este grado bajo de precisión se mantuvo en casi todas las culturas y civilizaciones hasta tiempos muy recientes. Los seres humanos se las arreglaban muy bien con términos semi-cuantitativos como grande, duradero, rápido, caliente, sólido o con frases comparativas o medidas imprecisas como “más alto que un álamo”, “a cinco pasos de mí”, “hace tres lunas”. Y a pesar de esto se alcanzaron notables logros tecnológicos. John Harrison en 1693 fue un relojero inglés, famoso por haber diseñado y puesto en funcionamiento el primer cronómetro marino de alta precisión, capaz de determinar la longitud con exactitud cuándo se han recorrido largas distancias. Su mérito principal es el haber resuelto el problema de la longitud mediante el empleo de cronómetros construidos por él mismo. Tener una medición del tiempo con precisión era una facultad muy requerida, pero gracias a un invento que supo llegar oportunamente, esto fue posible en el momento justo. Dicho invento es el cronómetro, un reloj mecánico de alta precisión certificado por institutos o

centros de control y que se utiliza para medir el transcurrir del tiempo con exactitud. También para realizar cuentas de glóbulos blancos se idearon métodos analíticos, que siempre buscaron alcanzar la precisión (Domingo, 2009).

Los primeros intentos para contar el número de células sanguíneas fueron realizados en el Siglo XVII, poco tiempo después de haber sido descubiertas por el investigador Van Leeuwenhoek, utilizando un rudimentario microscopio y la sangre de un pollo, este científico contó el número de eritrocitos presentes en una muestra, depositada en un capilar graduado de vidrio (John y Sons, 1988; Senac, 1749; Wintrobe, 1980).

Cabe destacar que en el siglo XVIII, en el año 1749 Jean Baptist Senac, señaló los corpúsculos pálidos que observó en su tratado sobre la estructura del corazón, acción y enfermedades, pero no dio interpretación de sus observaciones, así mismo, William Addison también encontró los vasos linfáticos descritos por Aselli. Observándolos en pájaros, reptiles y peces, señalando que no contenían glóbulos rojos, sino corpúsculos pálidos, que seguramente eran leucocitos (John y Sons, 1988; Senac, 1749; Wintrobe, 1980).

Más tarde en el siglo XIX aparecieron en París dos obras dedicadas a las células de la sangre, una de ellas fue el ensayo de hematología patológica, de Gabriel Andral, esta obra es la primera monografía escrita sobre hematología y en ella se pone especial atención a los procedimientos microscópicos y al contenido de glóbulos en la sangre. Posteriormente William Addison, así como otros observadores encontraron células incoloras o blancas en el pus, y suponían que venían de la sangre. El hecho que incremento el interés por el estudio de estas células fue la aparición de la leucemia, dicha enfermedad fue descubierta por Craigie, John Bennett y Rudolf Virchow. Cada uno de ellos describió un caso de autopsia, que reunían sorprendentes similitudes. Bennett pensó que se trataba de pus en la sangre, condición conocida en esa época como piohemia (Andral, 1843;

Donné, 1844; Adisson, 1842).

Sin embargo Virchow dio otra interpretación a los mismos cambios, explicando que la sangre normal tenía los mismos corpúsculos pálidos observados en el pus de individuos con infección, y eran iguales a los encontrados en la sangre de sus pacientes, lo que lo diferenciaba era que se encontraba mayor cantidad de corpúsculos pigmentados (eritrocitos) que corpúsculos pálidos (leucocitos), por ello se rehusó a llamarlo piohemia y le llamó simplemente sangre blanca (Izaguirre y De Micheli, 2005).

Posteriormente, en el Siglo XIX Burks desarrolló las técnicas de dilución de la sangre, que permitieron el diseño de cámaras más precisas. El resultado son cuentas más exactas, y más fáciles de realizar, utilizando una cámara rectangular, de poca profundidad con una delgada cubierta de vidrio, en la cual contiene la sangre diluida. La técnica general de determinación de células empleando un microscopio, en un contenedor transparente, se fue desarrollando gradualmente, a través de mejoras tanto al microscopio como al contenedor, hasta llegar al diseño de "cámaras de conteo", esto después de dos siglos de investigación continua (John y Sons, 1988).

En 1882, Richard Thoma, introdujo pipetas para diluir la sangre, y facilitar la cuenta de células, empleando ácido acético al 0,5%, para destruir los eritrocitos y contar solamente los leucocitos. El avance de estos estudios condujo a que en el siglo XX ya se conociera el origen y la morfología de las células sanguíneas, así como la variación que sufren durante algunas enfermedades, desarrollándose en ese entonces las bases del laboratorio clínico, de la clínica hematológica, así mismo como las técnicas de identificación celular (Weil, 1934; Verso, 1971; Izaguirre y De Micheli, 2005).

De esta manera en el Siglo XX, siguieron los avances en la electrónica y la electroóptica, realizándose muchos intentos para simplificar las cuentas de células sanguíneas, en el cual Coulter, sugería que estas podían ser de medidas simultáneas, para contar las células a través de la aplicación de un impulso eléctrico, al pasar a través de las mismas da como resultado una

corriente proporcional al volumen de estas. Argumentos similares fueron utilizados posteriormente para validar los sistemas de cuantificación con celdas fotoeléctricas. Así mismo, por medio de estas técnicas se inició el desarrollo de sistemas combinados con los cuales, se calcularon tanto el tamaño como el número de las células presentes en una muestra (Coulter, 1956; John y Sons, 1988).

En 1956, Coulter introdujo un contador automático de células, donde serían suspendidas en una solución electrolítica, inducidas a un flujo a través de un campo eléctrico, en un orificio pequeño taladrado en un zafiro delgado, el campo eléctrico que rodea este orificio pequeño, es la parte censora del instrumento. Gracias a la porción pequeña de la sección de censado, las células sanguíneas son detectadas y contadas casi una a una (Coulter, 1956).

La micropipeta moderna, icono de la biología, fue inventada hace 50 años por un científico alemán harto del manejo impreciso de fluidos, hoy en día, poca gente recuerda lo incómodo que era el pipeteado de microlitros antes de la llegada de la pipeta moderna, cuando se utilizaban varios tipos de capilares de vidrio y succión con la boca. Un pipeteado preciso requería experiencia y dependía del usuario y de la estructura de la pipeta. Las roturas, la imprecisión, el peligro de aspiración, la esterilidad y la limpieza eran un problema.

En 1956, Heinrich Schnitger, empezó inmediatamente a encontrar pegas al micropipeteado. Acabó desapareciendo del laboratorio un par de días y regresó con una jeringuilla de cristal modificada que iba equipada con un pistón accionado por resortes y un tope regulable para establecer el volumen de fluido. La aguja de la jeringuilla fue sustituida por una punta de plástico extraíble, obtenida de tuberías de ese material. Un amortiguador de aire separaba el fluido del pistón de la jeringuilla que confinaba el fluido a la punta de plástico. Para pipetear otra solución, sólo había que sustituir la punta fácilmente extraíble por otra, evitando así el lavado y las

contaminaciones. Esta función fue una gran innovación que acabaría catapultando a la micropipeta como instrumento de uso mundial. En los meses siguientes, Schnitger desarrolló el dispositivo experimental y lo convirtió en un prototipo de micropipeta. Se adoptaron medidas para garantizar el movimiento hermético del pistón y se añadió un segundo resorte coaxial, que permitía empujar el pistón con mayor resistencia y rebasar así el punto de salida para expulsar el fluido residual de la punta. De este modo se aseguró un pipeteado preciso y fácilmente reproducible de pequeños volúmenes. Con el nuevo instrumento, el personal poco experimentado podía manejar microlitros de soluciones con facilidad y exactitud (Kligerber, 2007).

Bases Teóricas

El método analítico

El método analítico o método de medida consiste en una secuencia lógica de procedimientos que se emplea en el laboratorio clínico para la determinación de diferentes sustancias (analitos). Se basan en las propiedades de las sustancias y deben proporcionar el conjunto de instrucciones que describen el procedimiento, materiales y el equipamiento que el analista necesita para obtener resultados. Estos métodos pueden ser cualitativos, semicuantitativos y cuantitativos (González, 1993; Gella, 1998; Cortés y col., 1996; Rodríguez y col., 2001).

Los métodos cuantitativos de valoración pueden ser aplicados de manera indirecta y directa. En el primer caso, es necesario separar el analito de otros compuestos, aplicando técnicas de separación o extracción antes de que éste sea sometido a la valoración, a fin de que dichos compuestos no interfieran con ésta. En el segundo caso, los métodos son aplicados directamente a la muestra. En ambos casos, el analito (por sus propiedades)

reaccionará con los reactivos específicos del método analítico, formando compuestos derivados medibles (González, 1993).

La sangre

La sangre es un líquido más denso y viscoso que el agua, debido a las células que tiene en suspensión. El volumen total de sangre circulante, representa entre el 6 y el 8% del peso corporal, es decir entre 4 a 6 litros (L) en un individuo adulto. El porcentaje más bajo, corresponde a la mujer y el más elevado al hombre, debido a que la mujer tiene mayor proporción de tejido graso que músculo esquelético y el tejido graso contiene menor cantidad de agua que el músculo. En los niños y las personas jóvenes este porcentaje supone entre el 8 y el 9% del peso corporal, debido al mayor contenido en agua del organismo (Tresguerres, 2009).

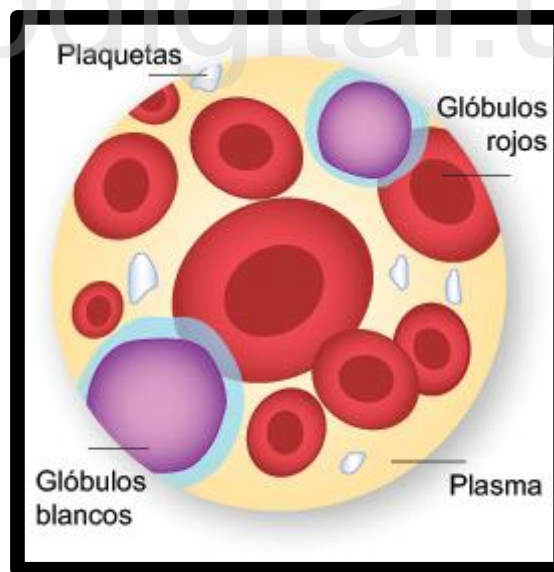


Figura .1 componentes de la sangre.

Fuente: (Tresguerres, 2009).

Funciones de la Sangre

La sangre tiene múltiples funciones, que mantienen una estrecha relación con sus componentes y con el sistema vascular. Los vasos desempeñan una función general de transporte (regulación térmica y distribución de sustancias), siendo los eritrocitos quienes efectúan el transporte de los gases de la respiración desde los pulmones a los tejidos oxígeno (O_2) y desde el tejido de vuelta a los pulmones dióxido de carbono (CO_2). Los leucocitos sirven para la defensa ante agentes patógenos y sustancias extrañas al cuerpo (defensa inmunitaria), y ayudan a estabilizar el pH interno (Starr y Taggart, 2006).

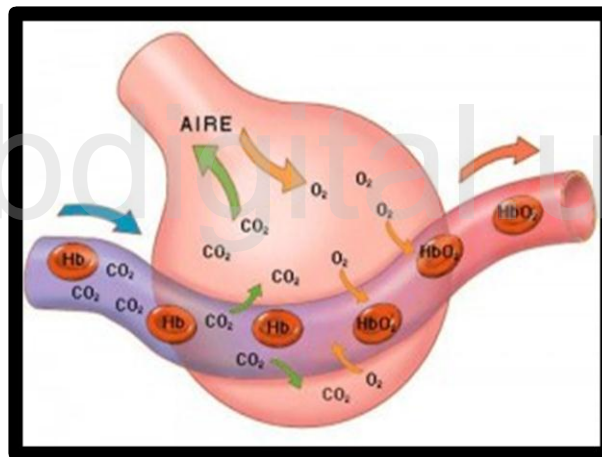


Figura 2. Función de la sangre

Fuente: ((Starr y Taggart, 2006).

Hematopoyesis

La hematopoyesis es el mecanismo fisiológico, responsable de la formación continua de los distintos tipos de células sanguíneas, a las que mantiene dentro de los límites normales en sangre periférica. Normalmente está regulada, por factores de crecimiento e interleucinas de gran complejidad, en los cuales las células hematopoyéticas interactúan entre sí, con su microambiente y con la matriz extracelular. Requieren un gran número de receptores de la superficie celular, en general glicoproteínas altamente especializadas que son factores de crecimiento indispensables para el desarrollo de las células (Del Busto y col., 2001).

Proceden de una célula progenitora común indiferenciada no comprometida, denominada célula stem, o célula madre pluripotencial, esta se puede diferenciar a distintos precursores, llamados células unipotenciales, o unidades formadoras de colonias, los cuales producen glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas. La célula madre pluripotencial se encuentra localizada en un tejido altamente especializado denominado hematopoyético (Gal y col., 2007; Manascero, 2003).

La localización del tejido hematopoyético en el organismo humano, varía con el desarrollo. En individuos adultos sanos, se lleva a cabo solo en la médula ósea; en el feto, las células hematopoyéticas se encuentran en altas proporciones en el hígado, el bazo y la sangre, inmediatamente después del nacimiento, la producción de células sanguíneas se desplaza progresivamente hacia la médula ósea. En los recién nacidos, el contenido de células hematopoyéticas en la sangre circulante es relativamente elevada; estas células también se encuentran, aunque en cantidades muy bajas, en la sangre del adulto. En el niño pequeño se encuentra una médula hematopoyética activa tanto en el esqueleto axial (cráneo, costillas, esternón, vertebras y pelvis) como en los huesos de las extremidades; en los adultos la médula hematopoyética está limitada al esqueleto axial y a los extremos

proximales del fémur y del humero, mientras que el resto se ha ido reemplazando por tejido adiposo (**Ver Figura 2**) (Gal y col., 2007).

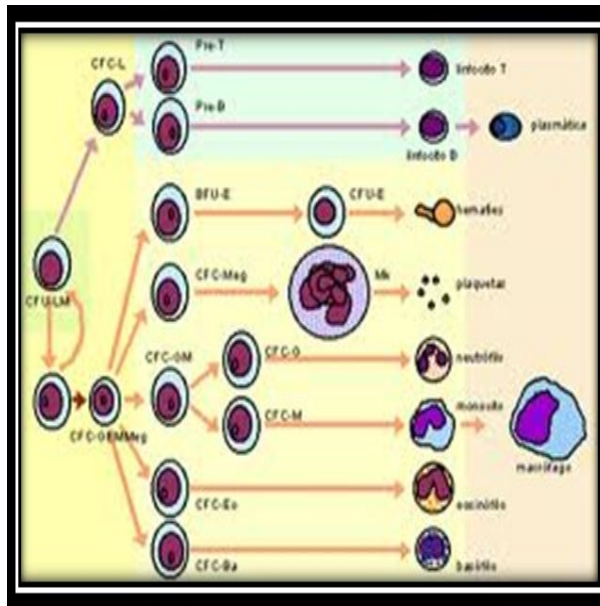


Figura 3. Hematopoyesis

Fuente: (Carr y Rodak, 2010)

www.bdigital.ula.ve

Cámara de Neubauer

Es también conocida como hemocitómetro, consta de los siguientes elementos:

- ✓ Una lámina portaobjeto gruesa, la cual en el centro presenta dos superficies cuadrículadas iguales, separadas del resto de la lámina, por surcos y dos barras transversales algo más elevadas.
- ✓ Una lámina cubreobjetos ópticamente plana, que al colocarse sobre las barras elevadas de la lámina, forma una cámara entre el cubreobjetos y la superficie cuadrículada. La altura entre el cubreobjetos y la lámina portaobjetos es de 0,1 mm. Las cuadrículas miden 3 mm de lado y se divide en 9 cuadrados grandes. Cada uno de los cuales mide 1 mm² de superficie, que se subdivide a su vez en 16 cuadrados medianos. El cuadrado grande central se divide en 25 cuadrados pequeños y cada

uno de ellos en 16 cuadrillos, los cuales miden 0,2 mm de lado (0,04 mm² de superficie), y cada cuadro mide 0,05 mm de lado (0,0025 mm² de superficie). (Ver Figura 2)(Muñoz, 2005).

Existe otro tipo de cámara de Neubauer, llamada cámara de Neubauer Improved, en la cual el cuadrado central está dividido en 16 cuadrados medianos en 0,25mm. Estos cuadrados medianos están a su vez divididos en 16 cuadrados pequeños de 0,05 mm (Castillo, 2004; Silva, 2004).

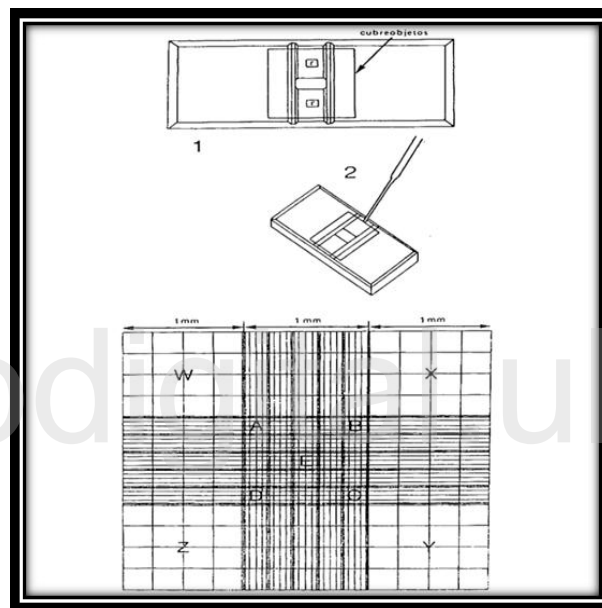


Figura 4. Cámara de Neubauer

Fuente: (Bernadette, 2004)

Pipetas automáticas

Usualmente llamadas micropipetas, se diseñaron para medir volúmenes muy pequeños, son dispositivos que funcionan por desplazamiento de aire de manera precisa. Usualmente se compone de un cuerpo, que en algunos modelos puede ser autoclave y resistente a la luz ultravioleta o sustancias químicas, y una punta plástica que se desprende del

cuerpo de la pipeta, en la parte superior del cuerpo, tienen un botón o perilla con el cual se selecciona el volumen a dispensar (Rodríguez, 2006).

Para cargar la pipeta con el volumen deseado, presionar el botón hasta el primer tope, introducir el extremo de la punta en el líquido a medir y dejar que el botón vuelva a su posición original. Para dispensar el líquido, colocar la punta en la pared del recipiente donde se va a dispersar y volver a presionar el botón hasta el primer tope; continuar presionando el botón hasta el segundo tope para expulsar el remanente de líquido; al terminar de dispensar los volúmenes deseados, acercar la micropipeta al recipiente de descarte de puntas y presionar el botón hasta el tercer tope, con lo que liberará la punta, o bien, hacerlo con el botón adicional para este menester (**Ver Figura 3**) (Rodríguez, 2006).



Figura 5. Pipeta Automática

Fuente: (Casado y col., 2012).

Precisión

La precisión expresa la concordancia aproximada entre una serie de mediciones obtenidas en múltiples pruebas de alguna muestra homogénea bajo iguales condiciones prescritas. Describe la reproducibilidad de las mediciones; la cual no implica que se repitan, se refiere a la dispersión del conjunto de valores obtenidos de mediciones repetidas de una magnitud. Cuanto menor es la dispersión mayor la precisión (Boquet y col., 1996; Baffi, 1997; Velásquez y col., 2006 ; Dharán, 1983).

Una medida común de la variabilidad es la desviación estándar (DE) de las mediciones y la precisión se puede estimar como una función de ella. Aunque son bastantes parecidas sus definiciones difieren en el hecho de que una tiene que ver con la cercanía al valor real y la otra se refiere a dar el mismo resultado en distintas mediciones; todo esto nos lleva a deducir que se puede ser exacto mas no preciso y viceversa. Sin embargo, para su medición se utiliza el CV, el cual en realidad mide la dispersión entre las mediciones (Boquet y col., 1996).

El coeficiente de variación (CV)

Es la expresión porcentual de la desviación estándar (DE) con respecto a la media (\bar{x}) o desviación estándar. Se prefiere utilizar el CV en lugar de la desviación estándar debido a que facilita su aplicación sobre cualquier magnitud de medida relativa (Day y Underwood, 1989; Skoog y Col, 1995; Dharán, 1983; Fernández,2001).

Entonces para determinar la precisión se debe repetir n (muestra) veces un ensayo para un mismo suero control bajo las mismas condiciones y determinar la media (\bar{x}) y DE (Parvy y col, 1993; Houbouyan y col, 1996; Ladizesky, 1994).

Estudio de la precisión

Para determinar la precisión se debe hacer énfasis en 2 principales criterios, que son utilizados en los laboratorios analíticos más sofisticados.

Repetitividad: Es la variación de las mediciones obtenidas con un instrumento de medición cuando es utilizado varias veces por un evaluador cuando mide la misma característica en la misma parte (Chang.,1998).

Reproducibilidad: Es la variación en el promedio de las mediciones hechas por diferentes evaluadores utilizando el mismo instrumento de medición al medir la misma característica en la misma parte (Chang,1998).

Evaluación de la precisión de un laboratorio

Datos por atributos: es un dato cualitativo (paso / no pasa) que puede anotarse para un registro o análisis.

Sistema de medición por atributos: es un sistema que compara cada parte con un estándar y acepta la parte si se satisface este estándar.

Auditoria: es una evaluación del 100% del producto usando técnicas de inspección (utilizando un sistema de medición por atributos).

Eficacia de la auditoria: la habilidad de un sistema de medición por atributos para distinguir correctamente un producto bueno de uno malo (Chang,1998).

Definición de Términos

La sangre: es un tejido corporal complejo, constituido por diferentes tipos de células y moléculas, incluyendo el agua, encontrándose compuesta por dos

partes principales: el plasma, que es el fluido intercelular, y las células, que están suspendidas en el plasma. Entre sus funciones está la de proveer de alimento y oxígeno a los tejidos, llevándose los productos de desecho de las células, y distribuyendo el calor que generan, para homogenizar la temperatura corporal; además transporta hormonas que estimulan y coordinan la actividad de los órganos, distribuyendo anticuerpos para combatir las infecciones (Ingraham, 1998; Serway y Faughn, 2001).

Glóbulos blancos o Leucocitos: son células casi incoloras, sin hemoglobina, presentan un protoplasma granuloso y un núcleo a veces lobulado. Su función principal es la defensa del organismo contra virus y bacterias; cuando son destruidos por las bacterias que los atacan o sus toxinas, sus restos forman el pus, su número fluctúa entre 6 y 8 mil por milímetro cúbico de sangre; los niños presentan mayor cantidad de leucocitos, y puede incrementar en las infecciones, si el número aumenta por encima de 12.000 GB/mm^3 , el trastorno se llama leucocitosis; si disminuye por debajo de 5.000 GB/mm^3 , se llama leucopenia; los glóbulos blancos no están confinados dentro de los vasos sanguíneos, sino que pueden migrar al espacio intersticial (Curtis, 2008; Gutiérrez, 2004).

Líquido de Türk: es un líquido diluyente, el cual está formado por ácido acético glacial, que destruye los glóbulos rojos, permitiendo una mayor visibilidad de los leucocitos, también se compone de una solución al 1% de violeta de genciana o azul de metileno, la cual sirve para teñir a los leucocitos y así permitirle una mayor visibilidad (Silva, y col., 2006).

Pipetas automáticas: Usualmente llamadas micropipetas, se diseñaron para medir volúmenes muy pequeños, son dispositivos que funcionan por desplazamiento de aire de manera precisa. Funcionan a través de un pistón que se encuentra en el cuerpo de la micropipeta. La posición de este pistón

(volumen seleccionado), determina la cantidad de líquido a dispensar por medio del desplazamiento de aire al presionar el pistón por medio del embolo de la micropipeta. Estas vierten volúmenes desde 1 a 1000 uL (Rodríguez, 2006; Segal., y col. 2005; Harris., 2007).

Precisión: es la desviación de los datos obtenidos en un ensayo de promedio del mismo, el cual consiste en realizar medidas con un error relativo suficientemente pequeño. La precisión de las mediciones en el experimento depende mayormente de la precisión del instrumento, del tamaño de muestra y del experimentador (Warren, 1975).

www.bdigital.ula.ve

Hipótesis

H_0 = Las pipetas automáticas no poseen precisión como método manual de cuantificación de leucocitos.

H_1 = Las pipetas automáticas poseen precisión como método manual de cuantificación de leucocitos.

www.bdigital.ula.ve

Sistema de Variables

Para la presente investigación que tiene como propósito conocer la evaluación de la precisión en una técnica de cuantificación de leucocitos se definieron dos tipos de variables:

Según su función

Variable dependiente

Determinación de glóbulos blancos

Variable independiente

Pipetas automáticas, reactivos, equipo de laboratorio.

Según su Naturaleza

Es una variable cuantitativa discreta ya que los resultados obtenidos son en números enteros.

Operacionalización de las Variables

La Operacionalización de las variables se presenta en la siguiente tabla (tabla N° 1):

Tabla 1. Operacionalización de la Variables

Objetivos Específicos	Variable	Dimensiones	Indicador
Evaluar la precisión de la pipeta automática.	Glóbulos blancos	- Linfocitos - Monocitos - Neutrófilos - Eosinófilos - Basófilos	-Tamaño de la Célula -Presencia o no del Núcleo. -Refringencia -Cantidad

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Enfoque de la Investigación

Un enfoque de tipo cuantitativo, ya que se encarga de la recolección y el análisis de datos para contestar preguntas de investigación, y probar hipótesis establecidas previamente, el cual consistirá en el uso de la estadística para establecer con exactitud patrones de comportamiento en una población.

www.bdigital.ula.ve

Tipo de Investigación

Según Hernández (2003), es correlacional, ya que pretende observar cómo se relacionan o no diversos fenómenos entre sí.

Según UPEL (2008), este trabajo corresponde a una investigación de campo, ya que se ocupa de la recolección de datos, tal como ocurre en la naturaleza, es decir sin manipulación de alguna variable. Un trabajo de campo significa sensibilizarse con el ambiente o lugar, identificar informantes que aporten datos adicionales, compenetrarse con la situación de investigación, además de verificar la factibilidad del estudio.

Diseño de la Investigación

Es una investigación experimental, la cual estudia relaciones causales entre variables, manipulándolas bajo condiciones controladas. El diseño básico de esta investigación es experimental.

Población

La población objeto de estudio estuvo conformada por los estudiantes de Hematología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis ULA, perteneciendo a una población mixta, sin discriminación, de sexo, edad, o patologías aparentes; ya que los mismos no representan variables para la investigación que se llevó a cabo.

Muestra

Se tomaron 30 muestras de sangre completa, obtenidas por punción venosa del antebrazo, mezcladas con el anticoagulante EDTA, que es el anticoagulante utilizado por excelencia en el área de hematología.

Materiales

- ✓ Guantes de Nitrilo, estériles. Marca: NOVAPLUS
- ✓ Gasa estéril. Marca: SERI'S. Mers 4"x4"
- ✓ Algodón hidrófilo aséptico. Marca: ALVE
- ✓ Alcohol Antiséptico al 70% v/v. Marca: EL GUARDIAN
- ✓ Banda elástica para torniquetes.
- ✓ Jeringas de plástico desechables. Marca: SERI'S. 5 mL, 21G 11/2"
- ✓ Tubos estériles tapa morada. EDTA K3. Vacuum Diagnostics, 13x75mm.

- ✓ Tubos de ensayo, estériles. 13x75 mm.
- ✓ Gradilla.
- ✓ Pipeta Automática de 100-1000µL. Marca: Erba Mannheim (Ver anexo1)
- ✓ Pipeta Automática de 5-50 µL. Marca: Erba Mannheim (Ver anexo1).
- ✓ Puntas amarillas, estériles; para pipeta automática.
- ✓ Puntas azules, estériles; para pipeta automática.
- ✓ Reactivo deTürck. Marca: Bioscience (Ver anexo 2).
- ✓ Hematímetro de Neubauer. Marca: BOECO (Ver anexo 3).
- ✓ Microscopio Nikon modelo: YS100 (Ver anexo 4).

Procedimientos

PARTE I: Toma de muestra sanguínea por parte de los estudiantes del área de Hematología de la facultad de Farmacia y Bioanálisis ULA, cumpliendo con las normas de bioseguridad establecidas dentro del laboratorio.

Técnica para extracción y obtención de la muestra sanguínea

- ✓ Se preparó previamente el material a utilizar.
- ✓ Se colocó el torniquete a unos 5cm por encima del pliegue del codo, con el fin de aumentar la presión venosa lo que hace que la vena sea más visible o palpable.
- ✓ La vena debe palparse para saber la dirección que trae. Puede ser palpable y visible o palpable y no visible.
- ✓ Una vez escogida la vena se retiró el torniquete y se procedió a realizar la asepsia con un algodón con alcohol, se secó con una gasa para evitar el ardor en el momento de introducir la aguja.
- ✓ Nuevamente se colocó el torniquete haciendo un lazo sin tocar el sitio elegido y se realizó la punción de la siguiente forma:

- ✓ Con el pulgar de la mano izquierda se hizo tracciones e inmovilizó la piel por debajo del sitio de la punción.
- ✓ Se realizó la punción penetrando la piel en un ángulo de 45° sobre el plano del antebrazo manteniendo el bisel y la calibración hacia arriba, penetrando en la vena aproximadamente 1cm. estando en vena la sangre fluyó observándose sangre en la punta de la jeringa.
- ✓ Cuando se obtuvo 1mL de sangre se soltó el torniquete y se retiró lentamente el mismo, aspirando la cantidad necesaria de sangre, sin hacerlo demasiado rápido para evitar la formación de espuma y de hemólisis (Muñoz et al, 2005).

PARTE II. Realización de la dilución de la sangre con la pipeta automática

- ✓ Con la pipeta automática, se aspiró 20 μ L (0,02 mL) de sangre total con anticoagulante.
- ✓ Se colocó en un tubo, el cual contenía 380 μ L de solución de Turck (obteniendo una dilución 1:20).
- ✓ El tubo donde se realizó la dilución, se agitó manualmente durante 3 minutos.
- ✓ Se montó la lámina de vidrio en la cámara para el recuento, la cual debe estar limpia y seca.
- ✓ Se dejó reposar por un espacio de 3 minutos para que las células se sedimentaran.
- ✓ Por último se enfocó con el objetivo de 10x y se contó los 4 cuadrados grandes angulares y el cuadrado grande central (Muñoz et al, 2005).

Sistema Estadístico

La evaluación estadística de los datos se realizó con un nivel de confianza del 95% en el programa estadístico SPSS versión 23 para Windows.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para evaluar la precisión en un método de cuantificación manual de leucocitos con pipetas automáticas por triplicado, la muestra quedó conformada por 30 estudiantes de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (ULA). Luego de obtenidos los resultados los mismo fueron analizados en el programa estadístico SPSS versión 23 para Windows.

Previamente se midieron los leucocitos por triplicado, obteniendo la media, observar en la (**tabla 2**). Para la primera repetición se obtuvo un promedio de 7.016 GB/mm³, para la segunda repetición el promedio se ubicó en 6.870 Gb/mm³ y para la tercera el promedio fue de 7.072 Gb/mm³, en general el promedio de todas las tripletas de las 30 muestras presentó un promedio de 6.986 Gb/mm³, estos resultados conjuntamente con la media de cada muestra fueron utilizado para determinar la variabilidad intraindividual e interindividual de los leucocitos.

Tabla Nº 2. Media de Valores de leucocitos en estudiantes de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA periodo 2015-2016.

Muestras	Repeticiones			Media
	1	2	3	
1	8280	9100	8840	8740
2	7120	6600	7840	7187
3	10800	9640	10400	10280
4	4600	4320	3920	4280
5	9760	9240	8600	9200
6	5040	4600	4800	4813
7	6840	6360	6640	6613
8	6640	6520	6240	6467
9	5120	4600	5480	5067
10	4240	4160	4360	4253
11	5080	5280	5560	5307
12	3840	3560	3960	3787
13	9720	10400	10600	10240
14	6120	6320	6550	6330
15	6200	6360	6420	6327
16	4800	3840	3560	4067
17	7920	7320	7535	7592
18	9200	9920	10000	9707
19	7720	7880	7840	7813
20	7520	6680	7680	7293
21	6920	6750	6600	6757
22	12520	12300	12600	12473
23	3800	3960	4360	4040
24	8680	8730	8900	8770
25	6720	6900	7100	6907
26	6150	6450	6520	6373
27	5750	5845	5930	5842
28	7325	7435	7630	7463
29	6680	6640	6750	6690
30	9360	8400	8955	8905
Media	7016	6870	7072	6986

Fuente: Elaboración propia

Se utilizó el coeficiente de variación como estadístico para determinar la precisión del método de cuantificación manual de leucocitos con pipetas automáticas por triplicado, este coeficiente tiene la particularidad que se expresa en porcentaje, en nuestro caso valores cercanos a 100% indica que hay mayor heterogeneidad entre los valores lo que se traduce en menor precisión, mientras que valores cercanos a 0% indican que los valores observados son homogéneos representando esto menor variabilidad y mayor precisión.

En cuanto a la variabilidad interindividual utilizando el coeficiente de variación, se tiene en general una variabilidad del 30,44%; al comparar entre los distintos repeticiones de la cuantificación de leucocitos, se tiene para la primera 29,79%, en la segunda 30,29% y en la tercera 29,31% (Ver Figura N° 6).

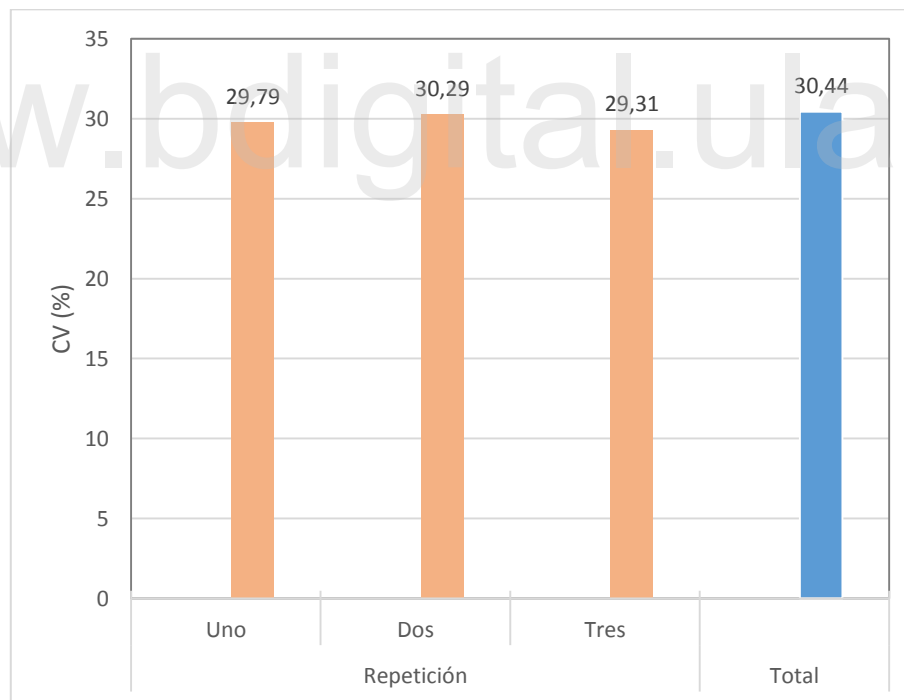


Figura 6. Gráfico de Comparación del coeficiente de variación en leucocitos de individuos interindividuales.

La variabilidad intraindividual mediante el coeficiente de variación para cada uno de las muestras, fluctuó entre 0,83% a 15,99%; es decir, mostró una baja variabilidad con lo cual se tiene en cada muestra buena precisión en la cuantificación manual de leucocitos con pipetas automáticas por triplicado. (ver tabla N° 3).

Tabla N°3 Comparación del coeficiente de variación en leucocitos intraindividual.

Muestras	DE	Media	CV
1	419,05	8740,00	4,79
2	622,68	7186,67	8,66
3	589,24	10280,00	5,73
4	341,76	4280,00	7,99
5	581,03	9200,00	6,32
6	220,30	4813,33	4,58
7	241,11	6613,33	3,65
8	205,26	6466,67	3,17
9	442,42	5066,67	8,73
10	100,66	4253,33	2,37
11	241,11	5306,67	4,54
12	205,26	3786,67	5,42
13	461,30	10240,00	4,50
14	215,17	6330,00	3,40
15	113,72	6326,67	1,80
16	650,33	4066,67	15,99
17	303,99	7591,67	4,00
18	440,61	9706,67	4,54
19	83,27	7813,33	1,07
20	537,15	7293,33	7,36
21	160,10	6756,67	2,37
22	155,35	12473,33	1,25
23	288,44	4040,00	7,14
24	115,33	8770,00	1,32

25	190,09	6906,67	2,75
26	196,55	6373,33	3,08
27	90,05	5841,67	1,54
28	154,46	7463,33	2,07
29	55,68	6690,00	0,83
30	481,95	8905,00	5,41

Nota: DE=Desviación estándar

Para el resultado de la variabilidad intraindividual se procedió a determinar los estadísticos descriptivos para el coeficiente de variación, donde a nivel general este coeficiente presentó un promedio del 4,15%, donde con el 95% de confianza, se encontró que la variabilidad en la cuantificación manual de leucocitos con pipetas automáticas por triplicado se encuentra entre el 3,27% y 5,04%, es decir, se tiene gran precisión en la cuantificación de leucocitos; por otra parte la mediana del coeficiente se ubicó en 4% muy similar al valor de la media y la amplitud intercuartil entre el cuartil 25 y 75 fue del 3,36% (ver tabla N° 4)

Tabla N° 4 Estadísticos descriptivos del coeficiente de variación en leucocitos intraindividual.

Descriptivos		Valores (%)
Media		4,15
IC 95%	LI	3,27
	LS	5,04
Mediana		4,00
Varianza		5,42
DE		2,33
Mínimo		0,83
Máximo		15,99
Rango		7,90
Amplitud intercuartil		3,36

Nota: DE=Desviación estándar

www.bdigital.ula.ve

Discusión

En nuestra investigación para el análisis de leucocitos con el método manual cuantitativo utilizamos 30 muestras, realizándolo por triplicado, es decir, 3 repeticiones, experiencia muy similar a la investigación de Santillán y colaboradores en el año 2009, donde publicaron un artículo, el cual se denominó: Validación del método analítico del citómetro XE-2100. En esta investigación utilizaron 6 muestras donde se les realizó 10 repeticiones. Ellos llegaron a la conclusión de que dicho equipo podía ser utilizado con confianza para la cuenta de leucocitos, resultados muy similares a los obtenidos en esta experiencia, en donde se obtuvo una variabilidad intraindividual mediante el coeficiente de variación para cada uno de las muestras, el cual fluctuó entre 0,83% a 15,99% y la variabilidad interindividual un 30,44%. Otra importante coincidencia de los resultados anteriores es con respecto a los de Escalona en el 2014, el cual evaluó el desempeño analítico en la determinación de colesterol (CT) y triglicéridos(TG), utilizando la precisión inter e intralaboratorio mediante el coeficiente de variación (CV). Sus resultados fueron los siguientes, en la precisión interlaboratorio el CV obtenido fue de 7,88% y 9,35% para colesterol y triglicéridos respectivamente, e intralaboratorio el CV para CT fue de 4,87% y para TG 5,84%, los cuales resultan muy similares a los nuestros. A nivel general logramos un coeficiente de variación de 4,15 % alcanzando un 95% de confianza, lo cual representa que estamos aceptando la hipótesis afirmativa (H1), es decir el método manual para la cuenta de leucocitos con pipetas automáticas posee precisión.

Conclusiones

Al evaluar el método manual cuantitativo para el conteo de leucocitos, con la pipeta automática obtuvimos un 95 % de confianza, que este método es repetitivo ya que es capaz de dar el mismo valor específico para una muestra, cuando se repite el análisis con el mismo instrumento. Logrando así los siguientes resultados: una variabilidad interindividual de un 30,44%, una variabilidad intraindividual que fluctuó entre 0,83% y 15,99% y un coeficiente de variación de 4,15%. Con lo cual podemos inferir que la determinación de leucocitos por el método manual con pipeta automática posee precisión con un coeficiente de variación bastante bajo.

www.bdigital.ula.ve

Recomendaciones

En relación a los resultados de la siguiente investigación se formulan las siguientes recomendaciones:

Es importante destacar que aun resultando el método de cuantificación manual con micropipetas para leucocitos, una técnica con resultados confiables. Se recomienda realizar estudios de la exactitud, para complementarlos con los de precisión.

Además, es oportuno aumentar el número de repeticiones (3), basándonos en las 10 repeticiones realizadas por Santillán y col., (2009) en su trabajo de investigación titulado como: Validación del método analítico del citómetro XE-2100, y comparación con el método convencional para las cuentas de leucocitos en líquidos corporales. De manera que la muestra seleccionada sea más representativa de la población motivo de estudio y obtener resultados más confiables.

www.bdigital.ula.ve

BIBLIOHEMEROGRAFÍA

- Addison W. (1842). ***On the colourless corpuscles and on the molecules and cytoblasts in the blood.*** Lond Med Gaz ii: 144-8.
- Andral G. (1843). ***Essai d'Hématologie pathologique.*** Paris: Fortin, Masson et Cie Lib.
- Arias, J., Ángeles, M., Arias, J.J y Aldamendi, J. (2000). ***Enfermería Médico-Quirúrgica.*** Madrid: Tébar.
- Baffi, R. the role of assay validation in specification development en: Brown, F., Fernadez, J., (eds): ***Development of specification for biotechnology pharmaceutical products*** .Del. Biol.Stand.Basel,Karger 1997, 91:105 -113.
- Brambila, E., Castillo, R y Lozano Zarain, P.III (2003). ***Comparación en tres métodos manuales empleados en la cuenta diferencial de leucocitos respecto a un equipo automatizado.*** Asociación Mexicana de bioquímica clínica, A.C.
- Bernadette, R.F. (2004). ***Hematología Fundamentos, y Aplicaciones Clínicas.*** Argentina: Panamericana, S.A.
- Boquet, E., Castillo, M., Cáceres, A., Dybkaer, R., Escutia, V., Francini, C., Jeffers, D., McClacthey, K., McQueen, M., Rej, R., Ruiz, G., Sierra, R., Terres, A., Tiburcio, H., y Wilde, C., (1996). ***Mejoria continua de la calidad .guía para laboratorios clínicos de América Latina.*** México: Médica Panamericana.
- Carr, J.H y Rodak, B.F. (2010). ***Altas de Hematología Clínica.*** Buenos Aires Argentina: Médica Panamericana, S.A.
- Casado Sánchez, E.M., Duran Barquer, P., Arias T.M y Paredes de la Sal, A.J. (2012). ***Operaciones Básicas de Laboratorio.*** Madrid-España: Paraninfo.
- Castillo, G. (2004). ***Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Estandarización, Intercalibracion, Resultados y Aplicaciones.*** 1ª Edición. México: IDRC.

- Chang, R., (1998): **Química**: México: 26-27.
- Cortés, M., Alsina, M., Salas, A. (1996) **Selección y evaluación de métodos**. En: Gonzales, F., **Bioquímica Clínica. Semilogia y Diagnostico: Interpretacion de los datos de laboratorio**. Barcelona: Editorial Barcelona.
- Coulter, W.H. (1956) **High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer” Pro, Natl. Electron. Conf.**, 12: 1034, 1956.
- Curtis, E., Schnek, A y Massarini, A. (2008). **Curtis Biología**. Buenos Aires-Argentina: medica panamericana S.A.
- Day, R. Underwood, A. (1989). **Química analítica cuantitativa**. México: Hispanoamericana S.A
- Del busto, F., Arcos y García, M. (2001). **Enfermería y Urgencias**. España: Arán Ediciones S.A.
- Dharán, M. (1983). **Control de calidad en los laboratorios clínicos**. Barcelona: Editorial reverté, S.A.
- Donn, A. (1844). **Cours de microscopie complementaire**. Paris: Baillié-re.
- Domingo, C. (1693). **Historia de la precisión**.
- Escalona, (2014). **Desempeño analítico en la determinación de colesterol y triglicéridos en laboratorios clínicos de la ciudad de Maracaibo Venezuela**. Venezuela: Artículo de revista.
- Fernández, C. (2001). **Supervisión externa de la calidad. Seminario introductorio de garantía de calidad en los servicios de Bioanálisis**: Mérida.
- Fink, E y Fernández, A. III. (1996) **.Evaluación externa de la calidad analítica en Hematología: Una necesidad en América Latina**. Panam. Salud pública.
- Freund, M. (2011). **Hematología: guía práctica para el diagnóstico microbiológico**. 11^a Edición .buenos Aires-Argentina. Médica Panamericana, S.A.

- García, P. (2002). ***Ventajas y problemas de los métodos automatizados de estudio de susceptibilidad in vitro.***
- Gal, B., López, M., Martín, A.I y Prieto Montalvo, S. (2007). ***Bases De La Fisiología.*** España: Tébar. 97-98.
- Gella, J. (1998). ***Metrología en el laboratorio clínico*** .Barcelona: BioSystems, S.A.
- González, S. (1993). ***Bioquímica Clínica: Bases y principios.*** Mérida: Universidad de los Andes.
- Harris, D. (2007). ***Análisis químico cuantitativo.*** 3° Edición China-California: Editorial reverté, S.A.
- Houbouyan, L., Boutie, B., Contant, G., Dautzenberg, M., Fievet, P., Potron, G., Vassault, A., Gormenlin, Y. (1996). ***Validation protocol of analytical hemostasis systems: measurement of anti-xa of low-molecular-weight heparins.***clin chem.
- Ingraham, J.L y Ingraham, C.A. (1998). ***Introducción a la Microbiología.*** España: reverté, S.A.
- Izaguirre, R y De Micheli, A. I. (2005, 02). ***Evolución del Conocimiento Sobre la Sangre y Su Movimiento,*** (57), 90.
- John Wiley and Sons. (1988) ***Encyclopedia of medical devices and instrumentation.*** Webster.
- Klingerberg, M. (2007). ***Historia de las micropipetas.***
- Ladizesky, M., Zeni, S., Mautalen, G. (1994). ***Precise measurement of bone mineral density in rats using dual-energy X-ray absorptiometry.*** Apptla.
- Leeson, Leeson, paparo. (1990) ***Histología*** .Interamericana.
- Manascero, A.R. (2003). ***Hematología Herramienta para el Diagnóstico:*** Atlas de morfología celular, alteraciones y enfermedades relacionadas. Santa fe de Bogotá: Javeriano.

- Navarro, R.J. (1999). **Conteo de células sanguíneas a Través de Imágenes de Microscopía**. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa: división de ciencias básicas e ingeniería.
- Rodríguez, N., Torres, D., Caravajal, M. (2001). **Confiabilidad del método de jaffe modificado por los laboratorios Heiga para la determinación automatizada de la creatinina**. Revista de la facultad de Farmacia.
- Rodríguez, E., Gamboa, M.M., Hernández, F y García Hidalgo, J.D. (2006). **Bacteriología General: Principios y Practicas de Laboratorios**. Costa Rica: Universidad de costa rica. 12-13.
- Rodríguez, M.C. (1997). **Manual de normas técnicas científicas y administrativas para en laboratorio clínico**. Santa fe de Bogotá: Ministerio de Salud.
- Santillán, J.G., Núñez, C.N., Morales, E y Mejía, E. IV. (2009, 12, 02). **Validación del Método Analítico del Clitómetro XE-2100 y Comparación con el Método Convencional para el Conteo de Leucocitos en Líquidos Corporales**. Revista mexicana de patología clínica, (56), 278-279.
- Silva, M.C y García, M.J. (2004). **Modulo I Hematología y Bioquímica. Manual del Técnico Superior de Laboratorio de Análisis Clínicos**. España: Mad, S.A.
- Senac JB. (1749). **Traité de la structure du coeur, de ses ation, et de ses maladies**. Paris: Briasson.
- Segal, C., Ortega, J. (2005). **Manual de practicas: biología molecular de la célula I**. 1º Edición.
- Skoog, D., West, D., Holler, M. (1995). **Química analítica**. México: Editorial Mc Graw-Hill.
- Starr, c y Taggart, r. (2008). Biología. **La Unidad y la Diversidad de la Vida**. México: Cengage Learning editores S.A de C.V.

Tresguerres, J.A., Villanúa Bernués, M.A y López Calderón, A. (2009). **Anatomía y Fisiología del Cuerpo Humano**. España-Madrid: McGraw-Hill/ Interamericana e España, S.A.U.

Velásquez, Y., Rodríguez, N., Mujica, X., Santiago, G., Vivas, S., Labrador, C., González, E., Lorente, A. (2006). **Evaluación de un método enzimático para la determinación de triglicéridos**. Revista de la facultad de Farmacia.

Verso, ML. y Aguilar (1971). **Some nineteenth century pioneers of hematology**. Med Hist 15:55-67.

Warren, F. (1975). **Manual de laboratorio**. Costa Rica. Editorial IICA.

Wintrobe M. (1980). Milestones **on the path of progress. William Hew-son. En: Blood, pure and eloquent**. New York: McGraw-Hill (pp11-14).

www.bdigital.ula.ve

ANEXOS

Anexo 1. Pipetas Automáticas



Fuente: Lucero S. Lilibeth C (2016).

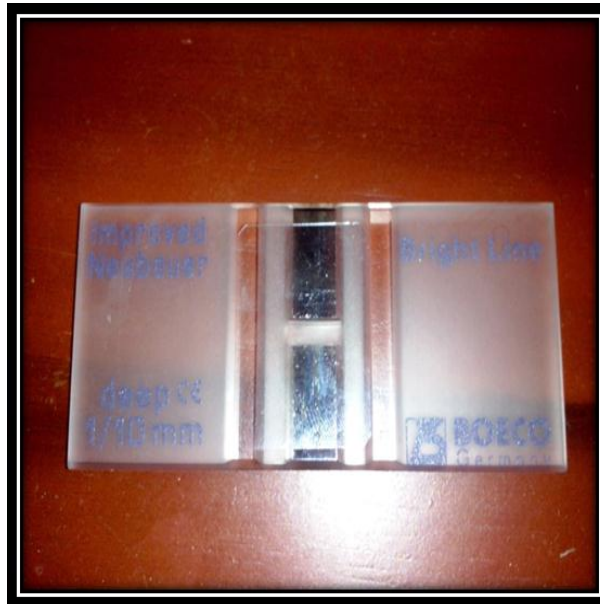
www.bdigital.ula.ve

Anexo 2. Liquido de Türk



Fuente: Lucero S. Lilibeth C (2016).

Anexo 3. Cámara de Neubauer



Fuente: Lucero S. Lilibeth C (2016).

www.bdigital.ula.ve

Anexo 4. Microscopio



Fuente: Lucero S. Lilibeth C (2016).