



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



**DIFERENCIAS EN LA CUANTIFICACIÓN DE LEUCOCITOS
CON PIPETAS TIPO THOMA Y PIPETAS AUTOMÁTICAS EN
MUESTRAS DE SANGRE DE ESTUDIANTES.**

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

**Autora: Márquez Pernia Neyla Yosmary
C.I: 20.572.982
Tutora: Prof. Castro Amaya Aribert**

Mérida, Febrero 2016



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



**DIFERENCIAS EN LA CUANTIFICACION DE LEUCOCITOS
CON PIPETAS TIPO THOMA Y PIPETAS AUTOMÁTICAS EN
MUESTRAS DE SANGRE DE ESTUDIANTES.**

www.bdigital.ula.ve

**Autora: Márquez Pernia Neyla Yosmary
C.I: 20.572.982
Tutora: Prof. Castro Amaya Aribert**

Mérida, febrero 2016.

DEDICATORIA

... A Dios todopoderoso
... A mi madre
... A mi padre
... A mi hermana
...A mi sobrinita
... A mi abuelita
...A toda mi familia

Neyla Y. Márquez P.

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTOS

A Dios todopoderoso, por estar siempre delante cubriendo y guiando mi camino, en los momentos más difíciles me mantuviste con fe y me llenaste de sabiduría. Gracias por tantas bendiciones.

A mi madre Maritza Pernia, mi incentivo, A ti te dedico esta gran meta te amo mami gracias por todos tus esfuerzos, que contribuyeron a hacer realidad este sueño.

A mi padre Néstor Márquez, gracias por apoyarme y motivarme a seguir adelante.

A mi hermanita Leyna Márquez, infinitamente agradezco contigo por haberme brindado tu cariño y confianza, siempre teniendo un estímulo con la seguridad de que lo lograría.

A ti Freddy, por apoyarme todo este tiempo, este triunfo también es tuyo porque has estado conmigo en los buenos y malos momentos y has vivido como yo este proceso.

A mi tutora Aribert Castro, por su destacada labor docente que con su ayuda y orientación fue posible la realización de este trabajo de investigación.

A mi sobrina hermosa Neylimar, a mi abuela Tomasa, a mis tíos (Ramón, Albeiro, Orlando, Miguel), a mis tías (Yolanda, Nelly, Edicta) primas (Thamara, Lilia, Roxana, Liseth, Nelitza, Alexandra, a mi madrina Fabiola, a

mis amigas (Johana, Isamar, Vanessa), y a todas aquellas personas que me tendieron la mano cuando más lo necesite.

A la Ilustre Universidad de Los Andes. **A Todos Gracias!!!**

[www,bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABLAS	xi
RESUMEN.....	xii
CAPÍTULO I EL PROBLEMA	
Planteamiento del Problema	3
Objetivos de la Investigación	8
Objetivo general	8
Objetivo específico.....	8
Justificación e Importancia de la Investigación.....	9
Alcances y Limitaciones de la Investigación.....	10
CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO	
Trabajos Previos.....	11
Antecedentes Históricos	13
Bases Teóricas	16
Propiedades de la Sangre.....	16
Composición de la Sangre	16
Funciones de la Sangre	17
Transporte.....	18
Protección.....	18
Composición del Plasma.....	19

Hematopoyesis	19
Factores Necesarios para la Formación de Células	
Sanguíneas.....	21
Eritropoyesis	22
Trombocitopoyesis	22
Leucopoyesis	23
Regulación de la Leucopoyesis.....	24
Leucopenia	24
Leucocitosis.....	25
Tipos de Glóbulos Blancos	25
Linfocitos	26
Monocitos	27
Segmentados Neutrófilos	29
Segmentados Eosinófilos	30
Segmentados Basófilos	32
Cámara de Neubauer	33
Pipetas Tipo Thoma.....	35
Pipetas Automáticas	36
Definición de Términos	37
Hipótesis.....	40
Sistema de variables.....	41
Operacionalización de las Variables.....	42

CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO

Enfoque de la Investigación	44
Tipo de Investigación.....	44
Diseño de la Investigación.....	45
Población y Muestra	
Población	45
Muestra	46

Materiales	46
Procedimientos.....	47
Parte I	47
Parte II	48
Parte III	49
Sistema Estadístico	51

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados	52
Discusión.....	52

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIÓN

Conclusiones	61
Recomendaciones.....	62

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
---------------------------------	----

ANEXOS	70
---------------------	-----------

1.Pipetas Automáticas.....	71
2.Líquido de Türck.....	71
3.Cámara de Neubauer	72
4.Microscopio	72
5.Resultados Obtenidos con el Equipo Automatizado.....	73
6.Resultados Obtenidos con el Equipo Automatizado.....	74
7.Resultados Obtenidos con el Equipo Automatizado.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Composición de la Sangre	17
Figura 2. Hematopoyesis	21
Figura 3. Trombocitopoyesis	23
Figura 4. Linfocitos.....	27
Figura 5. Monocitos.....	28
Figura 6. Neutrófilos.....	30
Figura 7. Eosinófilos.....	31
Figura 8. Basófilos.....	33
Figura 9. Cámara de Neufeld.....	34
Figura 10. Pipeta Tipo Thoma.....	35
Figura 11. Pipeta Automática.....	37
Figura 12. Equipo automatizado Mindray.....	50
Figura 13. Gráfico de normalidad con la pipeta tipo Thoma.....	54
Figura 14. Gráfico de normalidad con la pipeta automática	54
Figura 15. Cuenta de leucocitos por dos técnicas de cuantificación	56
Figura 16. Comparación métodos manuales con el equipo automatizado	60

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Operacionalización de las variables	43
Tabla 2. Prueba Normalidad: Resumen de Procesamiento de Casos	52
Tabla 3. Estadística Descriptiva Global Pipeta Tipo Thoma-Pipeta Automática.....	53
Tabla 4. Prueba de Normalidad Pipeta Tipo Thoma-Pipeta Automática .	53
Tabla 5. Pruebas de Muestras Emparejadas Pipeta Tipo Thoma-Pipeta Automática.....	55
Tabla 6. Pruebas de Normalidad Pipeta Tipo Thoma, Pipeta Automática y Equipo Automatizado.....	57
Tabla 7. Estadística Descriptiva Global Pipeta Tipo Thoma-Equipo Automatizado.....	57
Tabla 8. Prueba de Muestras Emparejadas Pipeta Tipo Thoma-Equipo Automatizado.....	58
Tabla 9. Estadística Descriptiva Global Pipeta Automática- Equipo Automatizado.....	59
Tabla 10. Prueba de Muestras Emparejadas Pipeta Automática-Equipo Automatizado.....	59

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
CÁTEDRA DE HEMATOLOGIA
MÉRIDA ESTADO MÉRIDA

**DIFERENCIAS EN LA CUANTIFICACIÓN DE LEUCOCITOS CON
PIPETAS TIPO THOMA Y PIPETAS AUTOMÁTICAS EN MUESTRAS DE
SANGRE DE ESTUDIANTES.**

Autor: Neyla Yosmary Márquez Pernia

Tutor: Aribert Castro Amaya

Mérida, Febrero de 2016

RESUMEN

En la actualidad los laboratorios clínicos, cuentan con equipos automatizados para la determinación de glóbulos blancos; Sin embargo las valoraciones con técnicas manuales siguen utilizándose con frecuencia. La metodología manual utilizada por excelencia a través de los años ha sido la técnica de la pipeta tipo Thoma, 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 determinar las diferencias en la cuantificación de leucocitos con pipetas tipo Thoma y pipetas automáticas en muestras de sangre de estudiantes. El estudio fue de tipo correlacional y de campo. Se analizaron 30 muestras a las cuales se les aplicó dos técnicas de cuantificación manual y ambas fueron tratadas bajo las mismas condiciones experimentales para la determinación de células sanguíneas. Luego de obtenidos los resultados se realizó una prueba de normalidad, en donde el 100% de los datos resultaron válidos, también se hizo una estadística descriptiva global, observándose que las medias entre ambas técnicas son muy similares, posteriormente se estudiaron en el programa estadístico IBM SPSS statistics 23, aplicándose la prueba T student's para muestras relacionadas con un nivel de confianza del 95%, obteniéndose un $p=0,278$ por lo tanto corroboramos que no existen diferencias significativas entre las pipetas tipo Thoma y las pipetas automáticas, además se procesaron 10 muestras al azar en el equipo automatizado encontrándose diferencias significativas con respecto a las técnicas manuales.

Palabras claves: Diferencias, cuantificación, leucocitos, pipetas tipo Thoma, pipetas automáticas.

INTRODUCCIÓN

La sangre es un líquido que contiene todos los elementos necesarios para la supervivencia de las células, está compuesta por un 55% de plasma y un 45% de células sanguíneas, dentro de las cuales se encuentran los glóbulos rojos, plaquetas y glóbulos blancos. Este vehículo de transporte de materiales, a través de los vasos sanguíneos es impulsado por el corazón, llega a los distintos lugares del organismo, formando parte del líquido extracelular (Tresguerres, 2009; Rodak, 2005).

Los glóbulos blancos o leucocitos son un conjunto heterogéneo de células sanguíneas que son los efectores celulares de la respuesta inmunitaria, intervinendo 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, exacta y precisa (Freund, 2011; Arias, 2000).

En la actualidad los laboratorios clínicos, cuentan con equipos automatizados para la determinación 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 (Santillán y col., 2009).

La metodología manual utilizada por excelencia para determinar las células blancas a través de los años, 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, que son dispositivos empleados para succionar y transferir pequeños volúmenes de líquidos, de manera que son mucho más fáciles y rápidas de manipular, además de tener un alto grado de precisión y exactitud (Navarro, 1999; Rodríguez, 2006). Sin embargo, esta práctica común en los laboratorios clínicos, carece de evidencias científicas, que permitan asegurar, que los resultados obtenidos con ambas técnicas de cuantificación son igual de reproducibles y confiables. Dicha interrogante es lo que ha planteado este trabajo de investigación: ¿Existirán diferencias en la cuantificación de leucocitos con pipetas tipo Thoma y pipetas automáticas en muestras de sangre de estudiantes?

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

Capítulo I: EL PROBLEMA, Planteamiento de Problema, Justificación e importancia de la Investigación, Objetivos de la Investigación, Alcance 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

En Venezuela los laboratorios clínicos son establecimientos públicos o privados, en los que se realizan los procedimientos de análisis de especímenes biológicos de origen humano, como apoyo a las actividades de diagnóstico, prevención, tratamiento, seguimiento, control y vigilancia de las enfermedades. 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).

Dentro de las áreas que comprende un laboratorio clínico se encuentran:

- ✓ **Química sanguínea:** incluye pruebas para el estudio del metabolismo de los carbohidratos, las proteínas, los lípidos, el agua, electrólitos, enzimas séricas, productos del metabolismo, oligoelementos, hormonas y niveles de medicamentos en la sangre, entre otros.

✓ Microbiología clínica: dentro de esta se encuentran las áreas de bacteriología, micobacterias, micología, parasitología, virología, serología y microbiología molecular.

✓ Inmunología clínica: donde se realizan pruebas de autoinmunidad y la inmunología celular.

✓ Uroanálisis: se refiere al análisis de la orina, clearance de creatinina, proteinuria, entre otras pruebas.

✓ Coproanálisis: donde se evalúan las heces, concentrado de heces, sangre oculta entre otras pruebas de diagnóstico gastrointestinal.

✓ Hematología: siendo esta el área con más demanda dentro de un laboratorio clínico, en la cual se realiza el recuento/morfología de las células sanguíneas, determinación de hemoglobina, pruebas de coagulación, grupo sanguíneo, técnicas moleculares, así como técnicas especiales (Gonzalez, 2011).

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 la mayor parte posible o en el mejor de los casos 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 del pipeteo manual (pipetas tipo Thoma, pipetas automáticas) y equipos automatizados (Navarro, 1999).

Las pipetas tipo Thoma para glóbulos blancos, presentan cerca del extremo superior una marca 11, inmediatamente continúa una dilatación (bulbo), que contiene una perla blanca que funciona como mezcladora, luego sigue el extremo más largo de la pipeta (tallo), que está dividida en 10 partes, con 2 marcas: 1 (parte final del bulbo), y 0,5 (a la mitad del tallo), acoplado a su extremo superior un tubo de goma para aspirar (Lynch y Raphael, 1983).

Las micropipetas o pipetas automáticas de ensayo, son instrumentos que simplifican la extracción y distribución de una muestra en una pipeta ordinaria, utilizan medios mecánicos o automáticos para su desalojamiento. En estos dispositivos, se pueden lograr, una exactitud aproximada del 98% y una reproducibilidad del 99%. Por su parte el método automático, el más comúnmente utilizado, emplea una válvula de corte para el dispositivo de muestreo (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; Santillan y col., 2009; Garcia, 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 otra parte, la manipulación y manejo de las pipetas tipo Thoma, han representado un desafío, cuando se manejan grandes volúmenes de pacientes, por la complejidad que se hace su uso y enrase en un tiempo limitado. En efecto, al pasar del tiempo y con el avance tecnológico, fueron sustituidas por las pipetas automáticas, las cuales permiten aspirar un volumen más exacto y preciso de una manera sencilla y rápida. Teóricamente ambas técnicas manuales deberían proporcionar resultados exactamente iguales (Brambila y col., 2003).

Por consiguiente, los laboratorios clínicos, tanto públicos como privados están en la obligación de prestar servicios de calidad al colectivo, haciendo necesario estudiar la relación existente entre ambas técnicas de 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:

¿Diferencias en la cuantificación de leucocitos con pipetas tipo Thoma y pipetas automáticas en muestras de sangre de estudiantes?

www.bdigital.ula.ve

Objetivos de la Investigación

Objetivo General:

- ✓ Determinar las diferencias en la cuantificación de leucocitos con pipetas tipo Thoma y pipetas automáticas en muestras de sangre de estudiantes.

Objetivos Específicos:

- ✓ Obtener los valores de glóbulos blancos con pipetas tipo Thoma y pipetas automáticas.
- ✓ Relacionar los valores obtenidos de leucocitos entre las dos técnicas de cuantificación.
- ✓ Comparar los resultados obtenidos de las técnicas manuales con el método automatizado.

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 escala definida; el 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, además de poseer un alto grado de precisión y exactitud. De esta manera, en el siguiente trabajo de investigación, se buscó demostrar si existen diferencias en los resultados reportados entre ambas técnicas de cuantificación de leucocitos.

Por ende, esta investigación pretende facilitar los conocimientos y las herramientas necesarias, para que los laboratorios tanto públicos como privados, utilicen las técnicas más rápidas, exactas 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 buscó relacionar dos técnicas manuales, para cuantificación de los glóbulos blancos o leucocitos, cumpliendo con los controles de calidad requeridos en los laboratorios clínicos y así determinar la relación existente entre ambas técnicas.

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

Navarro en el año 1999, presenta su tesis denominada: cuentas de células sanguíneas, a través de imágenes de microscopía, en este trabajo se realizaron diversos experimentos para el diseño y construcción de un contador de células sanguíneas, eficaz y de bajo costo. Para ello fue indispensable conocer ampliamente que tipos de contadores existían, cuáles eran los problemas principales de cada uno de los instrumentos, así como sus inconvenientes. A partir de la información recabada, recurrieron a la forma tradicional de recuento de células sanguíneas, utilizando como método de dilución la pipeta tipo Thoma; las cuentas se realizaron en cámaras de Neubauer, ya que este instrumento es el que se utiliza como patrón de validación para todos los instrumentos que se desarrollan y conocen comercialmente, trabajaron ampliamente con él, tomando imágenes de las muestras sanguíneas depositadas en la cámara de Neubauer, y se diseñaron diversos programas de cómputo para realizar la cuantificación de las células sanguíneas.

Por otra parte, Brambila y col., (2003), publicaron un artículo el cual se tituló: Comparación entre tres métodos manuales empleados en la cuenta diferencial de leucocitos respecto a un equipo automatizado. Prepararon extensiones por los métodos transversal, longitudinal, y de plumilla, simultáneamente evaluaron el número de leucocitos y el recuento

diferencial con un autoanalizado. Los métodos transversal y de la plumilla no mostraron diferencias significativas para los polimorfonucleares y neutrófilos, sin embargo, el recuento de neutrófilos por el método longitudinal mostró diferencias significativas, independientemente de los métodos, el recuento de linfocitos y monocitos mostró diferencias significativas en comparación con el equipo automatizado, llegando a la conclusión de que hay existencia de errores intrínsecos en los métodos manuales para el recuento de linfocitos y monocitos.

De igual manera, 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

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. 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, 1933; 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 incrementó 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 modificaciones 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).

Bases Teóricas

Propiedades de 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 el músculo esquelético y el tejido graso contiene menor cantidad de agua que el músculo. En los niños y las personas jóvenes ese porcentaje supone entre el 8 y el 9% del peso corporal, debido al mayor contenido en agua del organismo (Tresguerres, 2009).

Composición de la Sangre

La sangre se compone de plasma (principalmente agua) y de células en suspensión (hematíes, leucocitos y plaquetas). El plasma normalmente constituye entre el 55% y el 60% del volumen total de la sangre, pero puede reducirse un 10% con ejercicios intensos realizados en un ambiente

caluroso. Aproximadamente, el 90% del volumen del plasma es agua, un 7% son proteínas plasmáticas y el restante 3% son nutrientes celulares, electrolitos, enzimas, hormonas, anticuerpos y productos de desecho (**Ver Figura 1**) (Wilmore y Costill, 2007; Miale, 1985).

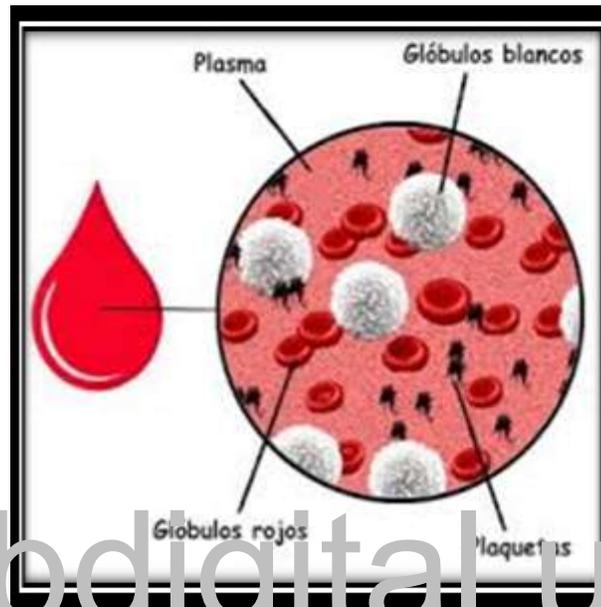


Figura1. Composición de la sangre

Fuente: (Roitt, 2008)

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 (O₂) y desde el tejido de vuelta a los pulmones dióxido de carbono (CO₂). 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).

Transporte

La sangre transporta gases, como el O₂ y el CO₂, tanto en forma de solución física como de unión química, además posibilita el intercambio de sustancias entre los órganos, y recibe de los tejidos los productos finales del metabolismo para transportarlo hacia el pulmón, el hígado y los riñones, con fines de eliminación (Koolman y Rohm, 2004: Thews y col., 1983).

Protección

En la sangre hay células especializadas, como leucocitos, linfocitos, entre otros, que tienen una función de defensa frente a agentes patógenos, así mismo, tiene plaquetas y factores de coagulación que nos protegen frente posible hemorragias (Thews y col., 1983).

Composición del Plasma

El plasma está constituido por un 91 a 92% de agua, 10g de electrolitos, como lo son: el sodio (Na^{2+}), cloro (Cl^-), calcio (Ca^{2+}), bicarbonato (HCO_3^-), fósforo (P), potasio (K^+), magnesio (Mg^{2+}), cobre (Cu^{2+}), hierro (Fe^{2+}), y sulfatos, un 65 a 80g de proteínas plasmáticas típicas, y el resto aproximadamente el 1,5% de otros solutos. De las proteínas, la más abundante es la albúmina, que es la principal responsable del valor de la presión oncótica del plasma; también, contiene globulinas (α_1 , α_2 , β y γ), fibrinógeno y otros factores de la coagulación; así mismo, encontramos componentes orgánicos no proteicos, como productos de desecho (urea, ácido úrico, creatinina, bilirrubina, sales de calcio), lípidos (ácidos grasos, glicerol, triglicéridos, fosfolípidos y colesterol), aminoácidos y glucosa, además de hormonas y diversas enzimas (Tresguerres, 2009; Thews y col., 1983).

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 raros, 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).

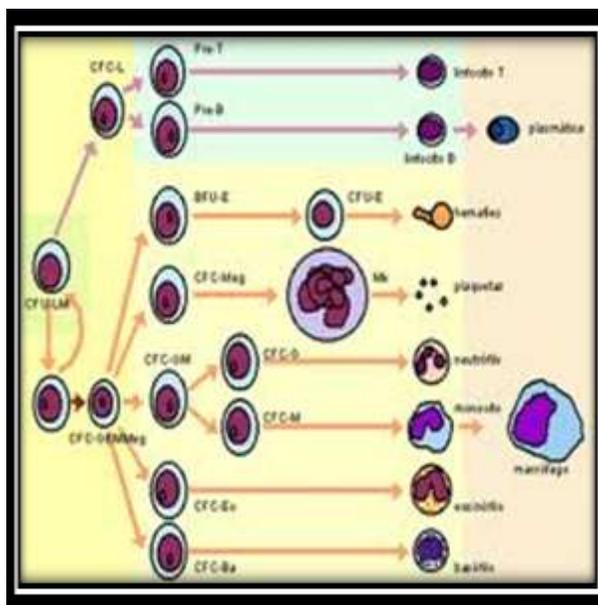


Figura 2. Hematopoyesis

Fuente: (Carr y Rodak, 2010)

www.bdigital.ula.ve

Factores necesarios para la formación de células sanguíneas

Para que se produzca una hematopoyesis normal son necesarios muchos factores, entre ellos un adecuado aporte de nutrientes, como lo son el hierro, el ácido fólico, la vitamina B12 y la vitamina B6, cuya deficiencia podría ocasionar alteraciones hematológicas (Requejo y Ortega, 2000).

Eritropoyesis

Es un proceso complejo encaminado a la producción de eritrocitos, fundamentalmente está regulado por la hormona eritropoyetina, que a su vez está regulada por la cantidad de oxígeno que llega a los tejidos. Cuando existe hipoxia tisular, aumenta la producción de eritropoyetina, estimulando la eritropoyesis; para la producción de eritrocitos se requiere cianocobalamina y folatos, los cuales son nutrientes necesarios para la síntesis de hemoglobina (Fuentes y col., 1998).

www,**bdigital**.ula.ve

Trombocitopoyesis

Es el conjunto de procesos que conducen a la formación y maduración de plaquetas o trombocitos, los cuales también se forman en la médula ósea, a partir de una célula precursora prediferenciada específica (UCF-Meg). Los estadios celulares en orden creciente de maduración son: megacarioblasto, megacariocito basófilo, megacariocito granuloso y megacariocito liberador de plaquetas, como podemos observar en la **(figura 3)**. En el proceso de maduración se forman numerosos gránulos y la membrana plasmática sufre un serie de invaginaciones, de manera que se va desarrollando una red interna de membranas, que fraccionan el citoplasma por tanto, las plaquetas carecen de núcleo y se originan por fragmentación del citoplasma del megacariocito, y de cada megacariocito se forman aproximadamente unas 5.000 plaquetas (Fox, 2003; Reina y Hernández, 2005).

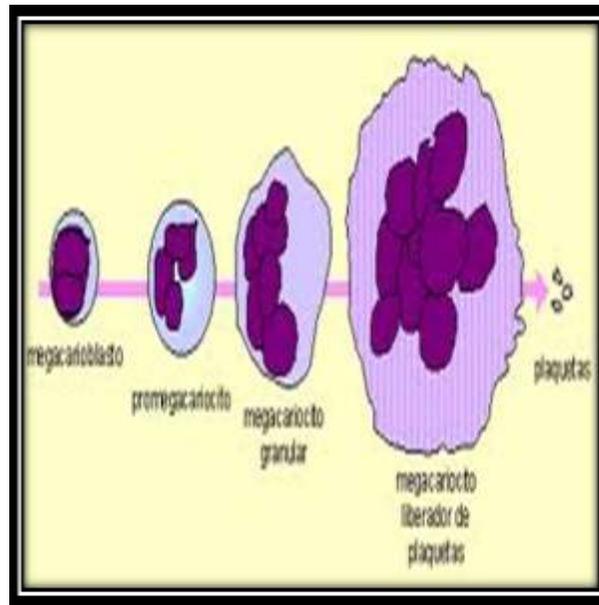


Figura 3.Trombocitopoyesis

Fuente: (Freund, 2011).

www,bdigital.ula.ve

Leucopoyesis

Es el proceso mediante el cual se producen leucocitos, proviene de las raíces griegas: leucos, que significa blanco y poyesis que significa producción, por lo tanto, es la producción de las células blancas, que ocurre normalmente en el tejido hematopoyético de la médula ósea. Se produce a partir de células progenitoras pluripotenciales, así como también por medio de la estimulación de una hormona leucopoyética específica. La célula progenitora sufre mitosis y madura hasta convertirse en uno de los diversos tipos de leucocitos, acorde con las necesidades del organismo, sean neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos; al madurar, estas células son liberadas a la sangre periférica, o permanecen en la médula

ósea, en un fondo común o reserva de almacenamiento hasta que sean necesarias (Núñez y Bouda, 2007; Manascero, 2003; House, 2001).

Regulación de la leucopoyesis

Diversas citoquinas estimulan diferentes estadios del desarrollo de los leucocitos. Las citoquinas que se conocen como factor de crecimiento multipotencial-1, interleuquina-1, e interleuquinas-3 tienen efectos generales, estimulando el desarrollo de diferentes tipos de leucocitos. El factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) actúa de una forma muy específica para estimular el desarrollo de los neutrófilos, mientras que el factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) estimula el desarrollo de monocitos. Se han clonado los genes de las citoquinas G-CSF y GM-CSF, lo que ha permitido que pueda utilizarse para aplicaciones médicas (Fox, 2003).

Leucopenia

Es el descenso de la cifra total de leucocitos por debajo de 5.000 leucocitos/mm³, traduce en términos generales, una depresión ejercida sobre la medula ósea, bien sea por afecciones virales, bacterianas o parasitarias. Es un trastorno clínico, en donde la medula ósea produce muy pocos

leucocitos, dejando el cuerpo desprotegido frente a muchas bacterias y otros microorganismos que invaden los tejidos (Rojas, 2004; Ángel y Ángel, 2006; .Guyton, 2006).

Leucocitosis

Es el incremento de leucocitos en la sangre, se presenta en diferentes etapas de la vida, por ejemplo, en el recién nacido el valor promedio es de 25.000 leucocitos/mm³ o más, en los niños, es normal un valor de 12.000 leucocitos/mm³, igual puede suceder en el tercer trimestre de embarazo. No obstante, su presentación patológica es provocada por infecciones bacterianas agudas, intoxicaciones graves, estados comatosos (coma urémico y coma diabético), dolores agudos y por los tumores malignos de crecimiento rápido (Cruz y Camargo, 2001; Guyton, 2006; Manascero, 2003).

Tipos de glóbulos blancos

Los leucocitos participan en distintas funciones de defensa del organismo, se desarrollan en el tallo celular de la medula ósea, funcionan en la defensa y protección inmunológica para el cuerpo. Hay diferentes tipos de leucocitos con diversos tamaños y formas del núcleo, así como también cantidad, pues depende de la actividad y salud del individuo. Son cinco tipos

de leucocitos, unos cuyo citoplasma es granuloso y de núcleo lobulado (eosinófilos, basófilos y neutrófilos), denominados granulocitos o polimorfonucleares y otros dos con citoplasma no granuloso (linfocitos y monocitos) (De Costa y Zamora, 1993; Rodríguez y col., 2009).

Los Linfocitos

Son células esferoidales, su citoplasma exento de gránulos, encierra un núcleo redondo u ovalado circundado por un delgado citoplasma. Cierta cantidad de linfocitos circulan por el torrente sanguíneo, donde su número oscila considerablemente en función de la edad; en los adultos la porción alcanza entre 25-40% presentes en la sangre y en los lactantes y niños pequeños es del 50-70%, probablemente muchos linfocitos no pasan nunca al sistema circulatorio (Thew, 1983).

Son las células del organismo capaces de reconocer y distinguir determinantes antigénicos diferentes, y de dar las características de la respuesta inmune adquirida. Los distintos tipos de leucocitos derivan de un precursor común en la médula ósea. La maduración de los linfocitos B se lleva a cabo principalmente en la médula ósea durante la vida adulta, tienen una vida media de 4-5 días y proliferan bajo la influencia de estimulaciones antigénicas, que inducen la formación de anticuerpos específicos. En cambio, la maduración de los linfocitos T se realiza en el timo. Hay dos tipos de linfocitos T: unos de vida corta, 4-5 días, y otros de vida más larga llamados linfocitos de memoria, que desempeñan en el momento de una reposición al antígeno, una función importante en las respuestas

anamnésicas (**Ver Figura 4**) (Nugales y col., 2005; García y González, 2000).

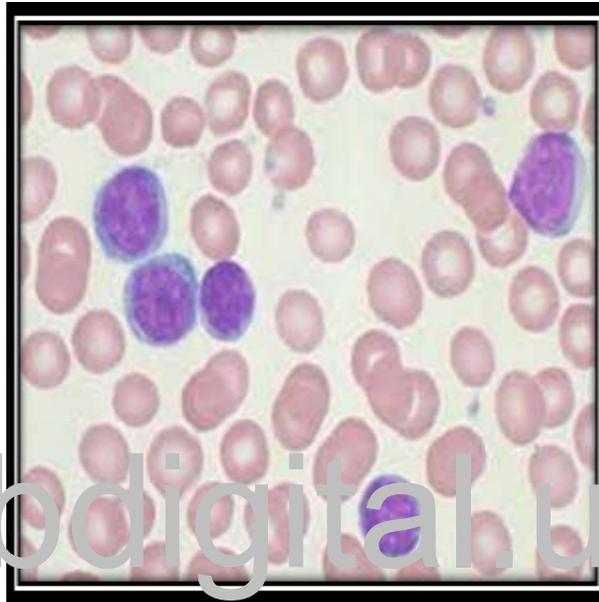


Figura 4. Linfocitos

Fuente: (Mcdonald, Paul y Cruickshank, 2001).

Los Monocitos

Son células hemáticas de mayor tamaño, su citoplasma contiene gránulos finos, el núcleo celular es grande, frecuentemente arriñonado, a veces lobulado, y por lo general, situado algo excéntricamente. Se diferencian de los granulocitos porque son más grandes y se encargan de

fagocitar y digerir las partículas extrañas y células deterioradas o viejas, incluyendo células tumorales. Se originan en la médula ósea, por lo general permanecen solo 12-24 horas en la sangre, donde totalizan el tejido conjuntivo para transformarse en macrófagos de vida larga (Thews, 1983; Welsch, 2010).

Los monocitos circulan en la sangre periférica marginándose en los capilares, con una vida media de 1 a 3 días, migran a los tejidos donde se diferencian a macrófagos con funciones especializadas según la locación anatómica: pulmón (macrófagos alveolares), hígado (células de Kupffer), hueso (osteoclasto), SNC (Sistema Nervioso Central) (microglia), riñón (células mesangiales) e histiocitos. Segregan enzimas hidrolíticas y los productos de necrosis tumoral (**Ver Figura 5**) (Brines y col., 1997).

www.bdigital.ula.ve

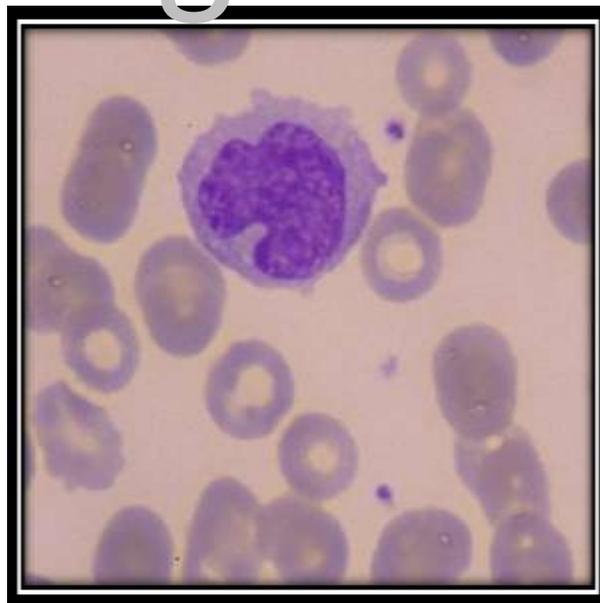


Figura 5. Monocitos

Fuente: (Mcdonald, Paul y Cruickshank, 2001).

Segmentados Neutrófilos (SN)

Son los glóbulos blancos más abundantes, pueden ser fácilmente identificados por poseer un núcleo segmentado (3 a 5 lóbulos). Son células terminalmente diferenciadas, su citoplasma se observa rosa suave, carecen de capacidad para sintetizar proteínas, de hecho son células capaces de sintetizar citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento como lo demuestran experiencias in vitro e in vivo (Stevens y Lowe, 2001).

Son las principales células mediadoras de la inflamación aguda, si la lesión tisular es leve, basta con los SN circulantes, si la lesión es externa, se liberan, incluidas algunas formas inmaduras de la médula ósea. Los SN al igual que otras células sanguíneas, se forman en la médula ósea, son células fagocíticas que normalmente ingieren y destruyen de 5-20 bacterias durante su expectativa de vida programada de 1 a 2 días. Además de ingerir bacterias y partículas extrañas, se liberan distintas citocinas, que incluyen pirógenos que producen fiebre y mediadores químicos de la respuesta inflamatoria. Por lo tanto, son capaces de la destrucción del agente patógeno mediante una doble capacidad digestiva: digestión intracelular por fagocitosis, pero además consiguen la digestión extracelular por liberación de sus enzimas lisosomales (**Ver Figura 6**) (Rabinovich, 2004; Arias y col., 1999).

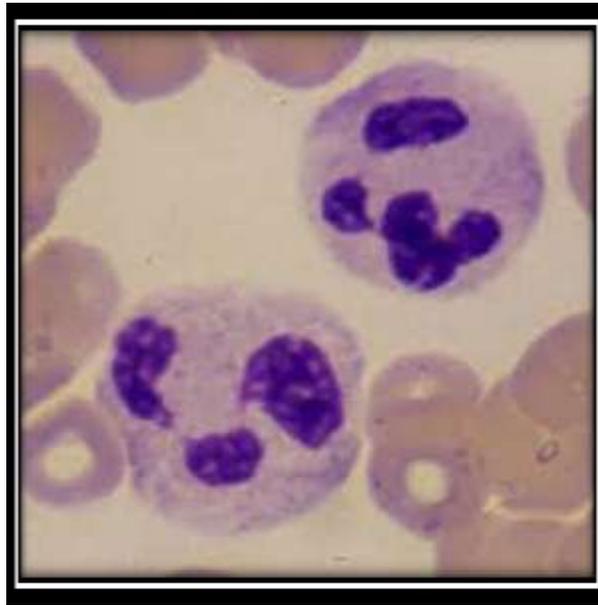


Figura 6. Segmentados Neutrófilos

Fuente: (Mcdonaldy col., 2001).

www.bdigital.ula.ve

Segmentados Eosinófilos (SE)

Son granulocitos, cuyos gránulos contienen proteínas básicas ricas en arginina. Se derivan de la médula ósea, constituyendo del 2 al 5% de los leucocitos sanguíneos en personas sanas; en cuanto a sus características morfológicas, presentan un núcleo bilobulado, y en su citoplasma se observan múltiples gránulos, que se tiñen de oscuro en presencia de peroxidasa. Su tamaño suele ser más grande que el del SN (Muños y García, 1997).

En cuanto a su origen, al igual que las otras células, su producción es en la médula ósea, la cual es controlada por los linfocitos T. Aunque están en

cantidades relativamente escasas en la sangre, forman parte del sistema defensivo del organismo dentro de los tejidos (Fidalgo y col., 2003).

La función principal de estas células, va dirigida hacia la destrucción de parásitos, así como la modulación de las reacciones de hipersensibilidad. Actúan como modeladores en el proceso inflamatorio por su habilidad para inactivar mediadores liberados por los SB, produciendo el abatimiento de las reacciones asociadas a la desgranulación de los mismos. La histaminasa de los eosinófilos destruye la histamina y a la sustancia de reacción lenta de la anafilaxia, también pueden lisar a la fibrina y actúan como fagocitos ingiriendo complejos inmunes y a los gránulos de los basófilos (**Ver Figura7**) (Arias, 2000).

www.bdigital.ula.ve

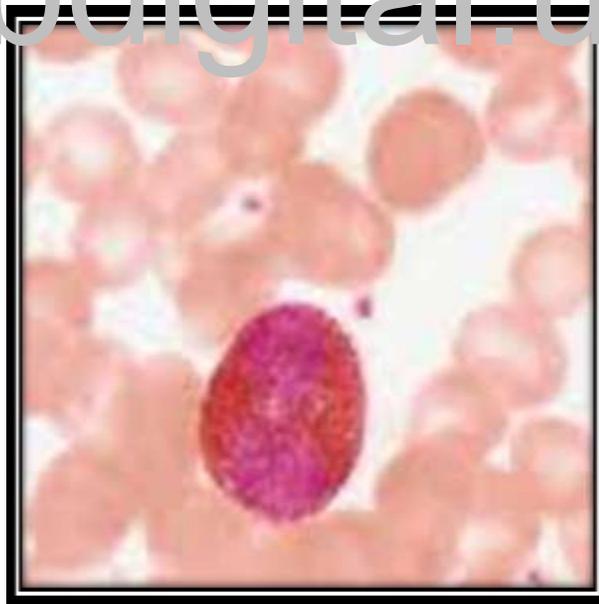


Figura 7. Segmentado Eosinófilo

Fuente: (Ross y Pawlina, 2007).

Segmentados Basófilos (SB)

Son los leucocitos polimorfonucleares menos abundantes y conocidos. Su rango de referencia es de 0 a 5%. Contienen mediadores de la inflamación como la histamina y heparina. Estas células no fagocitan, aunque realizan la desgranulación como respuesta a diferentes estímulos. Están íntimamente relacionados con los mastocitos, aunque estos se diferencian y permanecen en los tejidos, mientras que los SB se diferencian en la médula ósea y se dirigen a la sangre (Ingraham y Ingraham, 1998; Ross, 2007).

La función de los SB está relacionada desde el punto de vista funcional con los mastocitos del tejido conjuntivo, pero no son idénticos a ellos, tanto los mastocitos como los SB fijan un anticuerpo secretado por los plasmocitos (IgE), a través de receptores, expresados en la superficie celular, y derivan de la misma célula madre hemopoyética (**Ver Figura 8**) (Fidalgo, 2003).

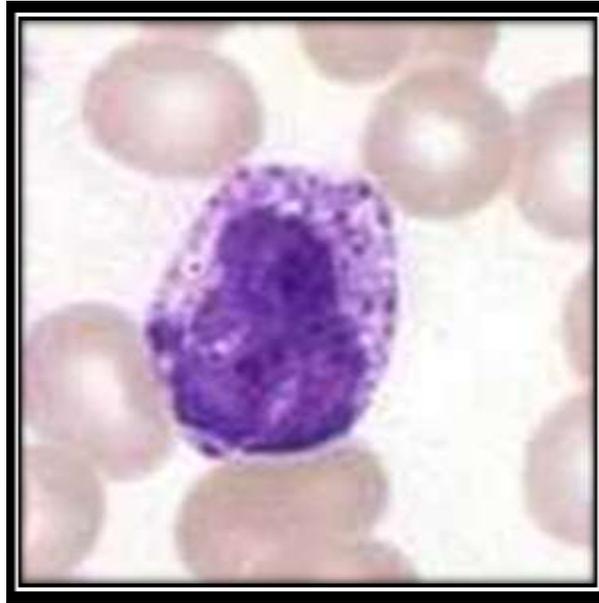


Figura 8. Segmentado Basófilo

Fuente: (Freund, 2011).

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 cuadritos, 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 9**) (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)

www.bdigital.ula.ve

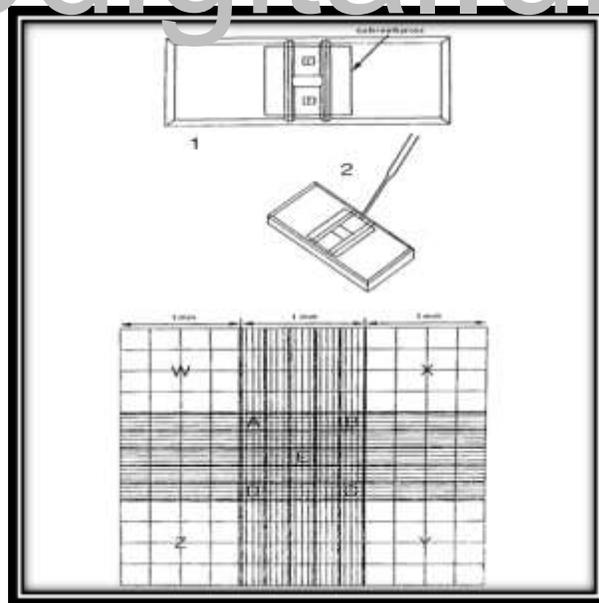


Figura 9. Cámara de Neubauer

Fuente: (Bernadette, 2004).

Pipetas Tipo Thoma

Presentan cerca del extremo superior una marca 11, inmediatamente continúa una dilatación (bulbo) que contiene una perla que funciona como mezcladora, luego sigue el extremo más largo de la pipeta (tallo) que está dividida en 10 partes, con 2 marcas: 1 (parte final del bulbo) y 0,5 (a la mitad del tallo). Se le acopla a su extremo superior 1 tubo de goma y una boquilla para aspirar (Navarro, 1999).

En la pipeta de recuento de leucocitos, el volumen de la porción dilatada (bulbo) es exactamente 10 veces la del tubo capilar, en las pipetas de recuentos de hematíes el volumen de la porción dilatada es 100 veces el del tubo capilar (Ver Figura 10) (Ruiz y col., 1995).

www.bdigital.ula.ve



Figura 10. Pipeta tipo Thoma para Leucocitos

Fuente: (Rubio y col., 2004).

Las 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 sustancia 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 dispensar 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 11**) (Rodríguez, 2006).



Figura 11. Pipeta Automática

Fuente: (Casado y col., 2012).

www.bdigital.ula.ve

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).

✓ **Plasma:** es un líquido claro y ligeramente amarillento que se obtiene después de sedimentar los elementos formes de la sangre mediante centrifugación. El plasma sanguíneo contiene un 10% de soluto, de los cuales una gran parte son proteínas, también contiene aproximadamente un 0,9% de sales inorgánicas, y el 2% restante lo constituyen diversos compuestos orgánicos no proteicos, constituyendo alrededor del 50% del volumen total de la sangre. El plasma contribuye también de forma muy importante en la regulación del pH y el transporte de gases respiratorios, como lo son el O₂ y el CO₂ (Garrido y col., 2006; Vives, 2006).

✓ **Glóbulos Rojos o eritrocitos:** son células sanguíneas, formadas básicamente por proteínas, por lo tanto carecen de núcleo y organelas; es el componente más abundante en la sangre. Tienen como función tomar el O₂ de los alveolos pulmonares, y llevarlos hasta las células de todo el organismo. Una vez dejado el O₂ toma CO₂ resultante del metabolismo celular y lo lleva a los pulmones, desde allí es expulsado al exterior (Vives et al., 2006).

✓ **Las plaquetas:** son los componentes celulares más pequeños de la sangre, cuando se aglutinan en forma normal, producen un efecto beneficioso porque impiden que se produzca una lesión mayor, evitando a la vez la posibilidad de un sangrado (Heredia, 2004; Aguilar, 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 cubico 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 Türck:** 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, 2006).

[www,bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

Hipótesis

✓ H_0 = No existen diferencias significativas en la cuantificación de leucocitos con pipetas tipo Thoma y pipetas automáticas en muestras de sangre de estudiantes.

✓ H_1 = Existen diferencias significativas en la cuantificación de leucocitos con pipetas tipo Thoma y pipetas automáticas en muestras de sangre de estudiantes.

www,bdigital.ula.ve

Sistema de Variables.

Para la presente investigación que tiene como propósito conocer la relación entre las dos técnicas de cuantificación de leucocitos se definieron dos tipos de variables:

Según su función:

✓ **Variable dependiente**

Determinar si hay diferencias entre las determinaciones con las dos técnicas pipetas tipo Thoma, pipetas automáticas.

✓ **Variable independiente**

Cuantificación de leucocitos con las pipetas tipo Thoma y pipetas automáticas.

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):

www.bdigital.ula.ve

Tabla 1. Operacionalización de la Variables.

Objetivos Específicos	Variable	Dimensiones	Indicador
Determinar los valores de los glóbulos blancos con la pipeta tipo toma	Glóbulos blancos	-Linfocitos - Monocitos -Neutrófilos -Eosinófilos -Basófilos	-Tamaño de la Célula -Presencia o no de Nucleó -Refringencia -Cantidad
Determinar los valores de glóbulos blancos con la pipeta automática	Glóbulos blancos	- Linfocitos - Monocitos -Neutrófilos -Eosinófilos -Basófilos	-Tamaño de la Célula -Presencia o no del Núcleo. -Refringencia -Cantidad
Verificar los resultados obtenidos de las técnicas manuales con el método automatizado	Los resultados obtenidos con ambas técnicas	Valores de referencia	De 5 a 1000 GB/mm ³

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.

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.

www,bdigital.ula.ve

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. Mors 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, 13x75 mm.
- ✓ Tubos de ensayo, estériles. 13x75 mm.
- ✓ Gradilla
- ✓ Pipeta tipo Thoma
- ✓ Pipeta Automática de 100-1000 μ L. Marca: Erba Mannheim (**Ver anexo 1**).
- ✓ Pipeta Automática de 5-50 μ L. Marca: Erba Mannheim (**Ver anexo 1**).
- ✓ Puntas amarillas, estériles; para pipeta automática.

- ✓ Puntas azules, estériles; para pipeta automática.
- ✓ Reactivo de Türck. 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.

www.bdigital.ula.ve

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).

www.bdigital.ula.ve

PARTE I. Realización de la dilución de la sangre con la pipeta tipo Thomas

- ✓ Una vez obtenida la sangre con anticoagulante, se succiono con la pipeta de glóbulos blancos hasta la marca 0,5.
- ✓ Se Introdujo la pipeta en un tubo, el cual contenía solución de Türck y se absorbió hasta la marca de 11, evitando hacer burbujas.
- ✓ Se tapó ambos extremos y se mezcló manualmente o en un rotador automático por 2 minutos.
- ✓ Se montó la lámina de vidrio en la cámara para el recuento, la cual debe estar limpia y seca.
- ✓ Se descartó las cuatro primeras gotas para luego colocar una gota pequeña de esta solución en la cámara.

- ✓ Se dejó reposar por un espacio de 3 minutos para que las células se sedimentaran.
- ✓ Finalmente se enfocó con el objetivo de 10x, contando los 4 cuadrados grandes angulares y el cuadrado grande central (Muñoz et al, 2005).

PARTE III. 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).

Las muestras fueron analizadas por triplicado, manteniendo estricto control de calidad, en el laboratorio de la cátedra de Hematología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis ULA. Además, 10 muestras al azar, fueron ensayadas en el equipo automatizado marca Mindray modelo BC-5100 ver en la **(figura 12)**; para comparar los resultados obtenidos con las técnicas manuales ver **(anexos 5, 6 y 7)**. Adicionalmente, garantizando la correcta emisión de resultados, se utilizó el control de calidad para hematología marca Mindray BC-5D. Dicho instrumental se encuentra ubicado en el laboratorio clínico SAEC, hospital San Juan de Dios, en la ciudad de Mérida, Estado Mérida.



Figura 12. Equipo Automatizado Mindray
Fuente: Márquez P. Neyla Y. (2016)

Sistema Estadístico

La evaluación estadística de los datos se realizó con un nivel de confianza del 95%, en el programa estadístico IBM SPSS statistics 23 para Windows. Se aplicó la prueba T student's para muestras relacionadas.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para determinar si existían diferencias entre ambas técnicas manuales para cuantificación de leucocitos, se utilizó un total de 30 muestras, ambas fueron tratadas bajo las mismas condiciones experimentales para la determinación de células sanguíneas. Luego de obtenidos los resultados, los mismos fueron analizados en el programa estadístico IBM SPSS statistics 23, aplicándose la prueba T student's para muestras relacionadas.

Previamente se realizó la prueba de normalidad; poder observar en la tabla 2, que el 100% de los casos son válidos, es decir, no hay datos perdidos. Además, en la estadística descriptiva global (tabla 3), las medias de las cuantificaciones de leucocitos con pipeta tipo Thoma ($6626,80 \pm 366,72$) y pipeta Automática ($6717,33 \pm 362,98$) son muy similares, sin embargo, fue necesario realizar la prueba T para la comparación de medias, y así corroborar si la similitud es o no significativa.

Tabla 2. Prueba Normalidad: Resumen de Procesamiento de Casos.

Técnicas	Casos					
	Válido		Perdidos		Total	
	Nº	Porcentaje	Nº	Porcentaje	Nº	Porcentaje
Thoma	30	100,0%	0	0,0%	30	100,0%
Automática	30	100,0%	0	0,0%	30	100,0%

Tabla 3. Estadística Descriptiva Global Pipeta tipo Thoma-Pipeta automática

Descriptivos					
Técnicas	Media	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo	Curtosis
Pipeta Tipo Thoma	6626,80	366,72	2160	10000	-,108
Pipeta Automática	6717,33	362,98	2400	9645	-,443

En la tabla 4, se pueden ver los resultados para la prueba de normalidad; debido a que la muestra estuvo conformada por 30 ($n: 30$), se usó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk ($n < 30$). Los datos de la variable aleatoria glóbulos blancos se comportó normalmente (**figuras 13 y 14**), tanto en las medidas con la pipeta tipo Thoma con un $p = 0,128$, como con la pipeta automática con un $p = 0,195$. Por ende, se pudo continuar con la prueba estadística.

Tabla 4. Pruebas de normalidad Pipeta tipo Thoma-Pipeta automática

Técnicas	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Thoma	,111	30	,200 [*]	,946	30	,128
Automática	,121	30	,200 [*]	,952	30	,195

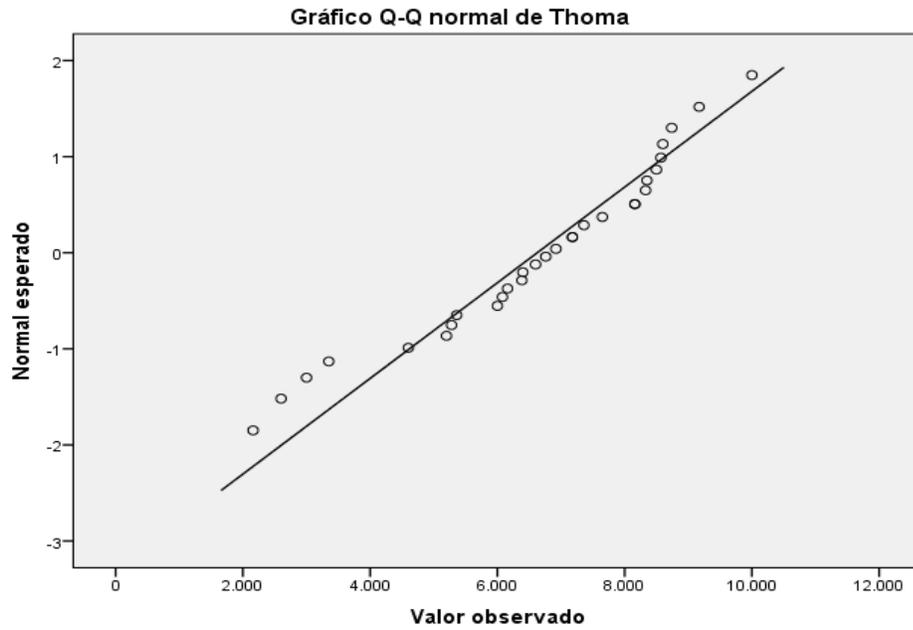


Figura 13. Gráfico de normalidad con la pipeta tipo Thoma

www.bdigital.ula.ve

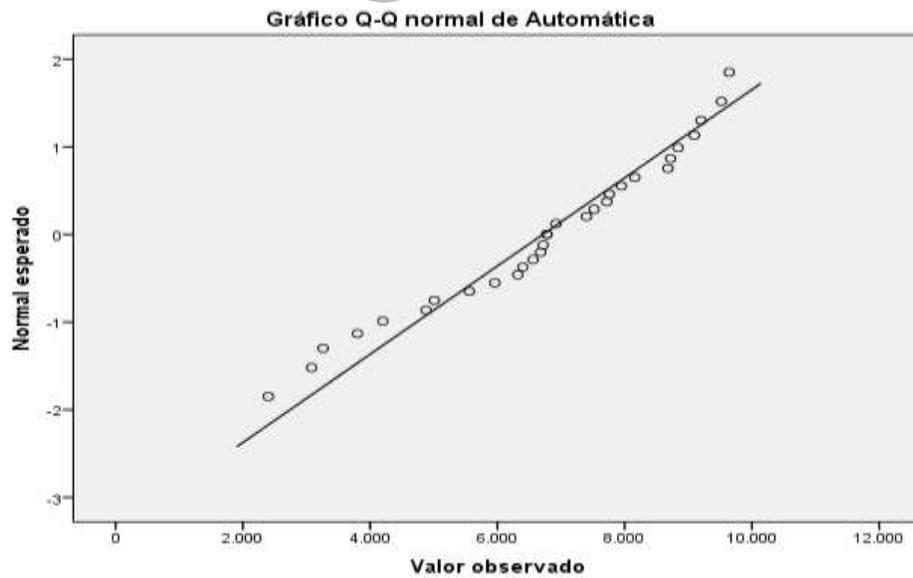


Figura 14. Gráfico de normalidad con la pipeta Automática

Prueba T para muestras relacionadas Pipeta tipo Thoma-Pipeta Automática:

Los resultados de la prueba de T students para muestras relacionadas los observamos en la **(Tabla 5)**, con un valor $p=0,278$. Dicho resultado acepta la hipótesis nula, por lo tanto asumimos con un 95% de confianza, que no existen diferencias significativas entre las técnicas manuales para cuantificación de glóbulos blancos **(Figura 15)**. Nuestra experiencia coincide con lo reportado por Navarro en el año 1999, en la cual valida un método de cuentas sanguíneas a través de imágenes de microscopía, comparando con el método convencional en cámara de Neubauer, sin encontrar diferencias significativas entre ambos métodos. Es importante destacar, que pese a ser las técnicas de cuantificación de leucocitos, un tema de suma importancia en la práctica analítica, hay carencia de trabajos de investigación al respecto.

Tabla 5. Prueba de muestras emparejadas Pipeta tipo Thoma-Pipeta Automática

Técnicas		Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	Thoma - Automática	- 90,53	448,59	81,90	- 258,04	76,97	- 1,11	29	,278

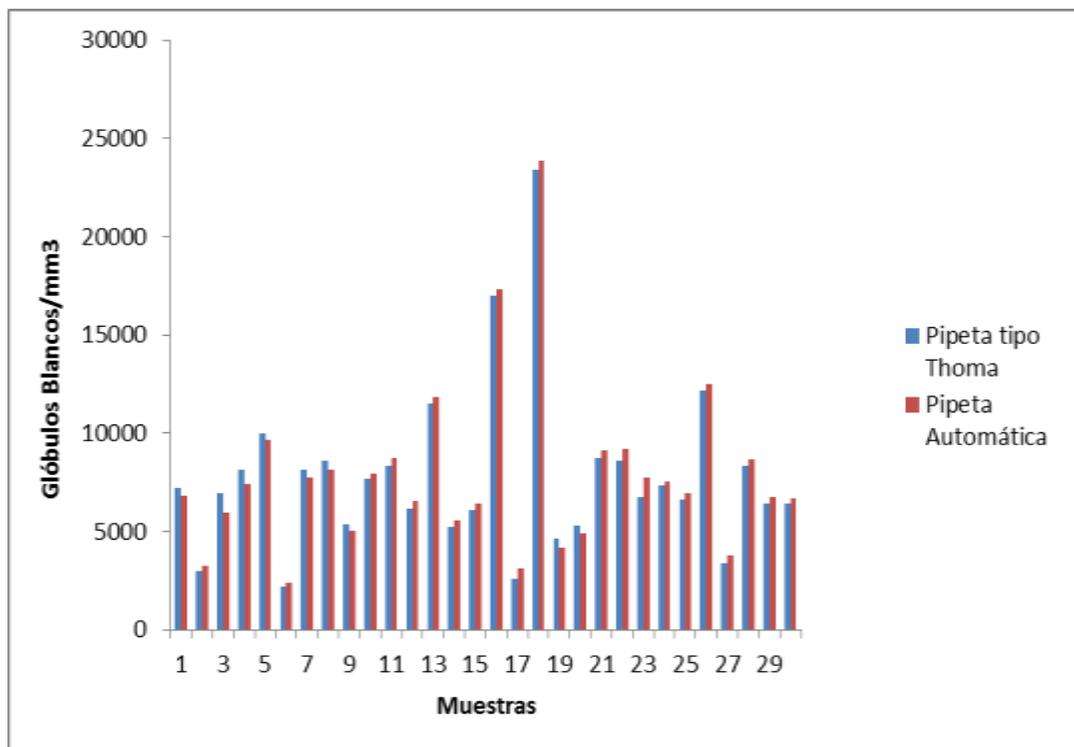


Figura 15. Cuenta de Leucocitos por dos técnicas de cuantificación

www.bdigital.ula.ve

Comparación de las técnicas de cuantificación manual con el equipo automatizado:

Luego se realizó estudios de normalidad a las muestras seleccionadas para el estudio al azar con equipo automatizado. En la **(tabla 6)** contemplamos los resultados; la muestra estuvo constituida por 10 (n: 10), por lo tanto se utilizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk ($n < 30$). Los datos de la variable aleatoria glóbulos blancos se comportó normalmente tanto en las medidas con la pipeta tipo Thoma $p = 0,079$, pipeta automática $p = 0,237$ y con el equipo automatizado con un $p = 0,351$.

Tabla 6. Pruebas de normalidad Pipeta Tipo Thoma, Pipeta automática y Equipo Automatizado

Técnicas	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Thoma	,243	10	,098	,861	10	,079
Automatizado	,205	10	,200 [*]	,919	10	,351
Automática	,222	10	,178	,903	10	,237

Prueba T para Muestras Relacionadas: Pipetas Manuales-Equipo Automatizado

www.bdigital.ula.ve

Al contrastar las medias de los valores de leucocitos con la pipeta tipo Thoma ($9180,00 \pm 1710,08$) y equipo automatizado ($9760,00 \pm 1790,22$), se muestra una mínima diferencia de 580 células (**Tabla 7**); sin embargo, al comparar medias con la prueba T students (**tabla 8**), se obtuvo un $p=0,000$, lo que quiere decir, que existen diferencias significativas entre ambos métodos de cuantificación de leucocitos. Al comparar el método automatizado con la pipeta automática, los resultados mostraron la misma tendencia (**figura 16**).

Nuestros resultados corresponden con Brambila y colaboradores en el 2003; Estos investigadores reportaron que al comparar tres métodos manuales para la cuenta diferencial de leucocitos con respecto a un equipo automatizado, encontraron diferencias significativas, concluyendo que la existencia de errores intrínsecos introducidos en la metodología manual utilizada influye en los resultados; los cuales se caracterizan por ser errores

propios e inevitables ocasionados por el analista o propios del instrumental utilizado.

Tabla 7. Estadística descriptiva global Pipeta tipo Thoma-Equipo Automatizado

Técnicas		Media	Nº	Desviación estándar	Media de error estándar
Par 1	Thoma	9180,00	10	1710,08	540,773
	Automatizado	9760,00	10	1790,22	566,117

www.bdigital.ula.ve

Tabla 8. Prueba de muestras emparejadas Pipeta tipo Thoma-Equipo Automatizado

Diferencias emparejadas						t	gl	Sig. (bilateral)
Media	Desviación estándar		Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
				Inferior	Superior			
Par 1	Thoma -	-580,00	70,49	-739,46	-420,54	-8,23	9	,000
	Automatizado	222,91						

Tabla 9. Estadística descriptiva global Pipeta automática-Equipo Automatizado

Estadísticas de muestras emparejadas					
Técnicas		Media	Nº	Desviación estándar	Media de error estándar
Par 1	Automatizado	9760,00	10	1790,22	566,12
	Automática	9441,00	10	1690,04	534,44

Tabla 10. Prueba de muestras emparejadas Pipeta automática-Equipo Automatizado

Técnicas		Diferencias emparejadas					Sig. (bilateral)		
		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	Automatizado - Automática	319,00	127,93	40,45	227,49	410,51	7,88	9	,000

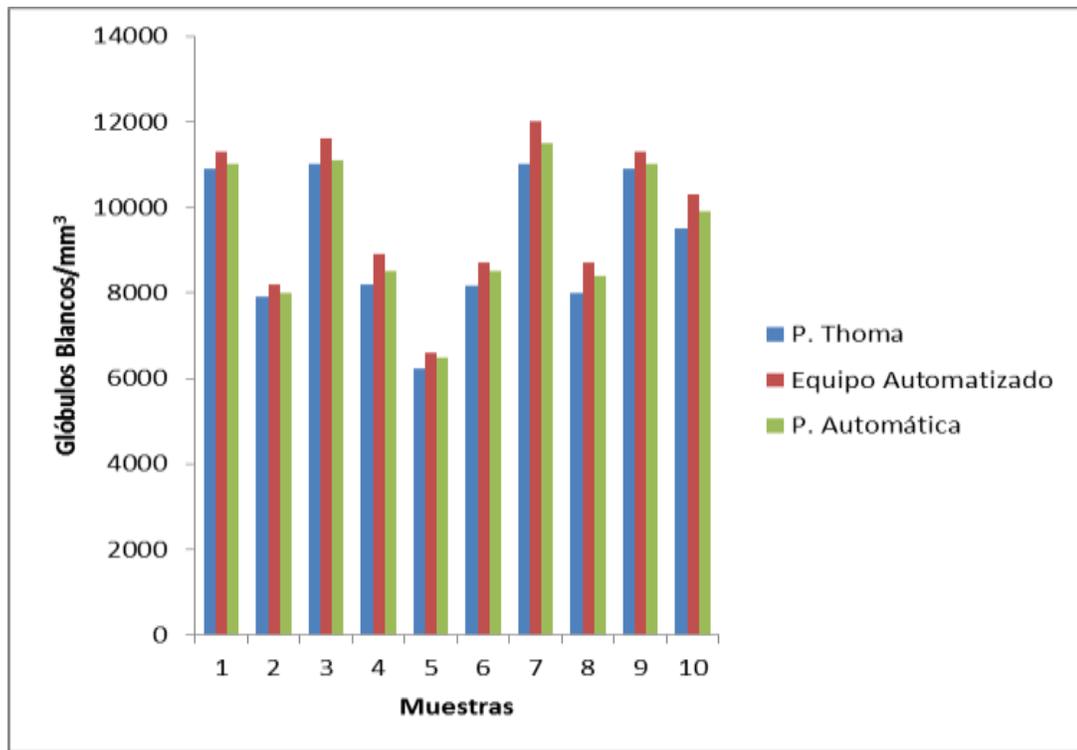


Figura 16 Comparación de los métodos manuales con el equipo automatizado.

www.bdigital.ula.ve

CONCLUSIONES

Con un 95% de confianza podemos concluir que las técnicas manuales pipeta tipo Thoma y pipeta Automática, proporcionan resultados para la cuantificación de leucocitos semejantes, por lo tanto, podemos inferir que la sustitución realizada por los analistas en los últimos años de la pipeta tipo Thoma por las micropipetas es una práctica válida, rápida y exacta, que permite brindar resultados confiables a los pacientes.

Sin embargo, es importante asentar, que al relacionar ambas técnicas manuales con el equipo automatizado, se encontró diferencias significativas, asumiendo que puedan ser el resultado de errores intrínsecos propios de los métodos manuales, aunado al bajo número de muestras utilizadas para dicha comparación.

www.bdigital.ula.ve

RECOMENDACIONES

Es importante destacar que aun resultando el método de cuantificación manual por micropipetas para leucocitos, una técnica con resultados sin diferencias significativas con respecto a las pipetas tipo Thoma, es necesario realizar estudios de precisión y exactitud, para dar su recomendación como técnica analítica.

Además, es oportuno aumentar el número de muestras ($n > 30$) para realizar una comparación confiable con respecto al método automatizado y poder apreciar la inherencia de los errores intrínsecos introducidos por el método y el analista.

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.

Aguilar, J.L., De Andrés, J.A., De León, O., Gómez, A., Montero, A y Torres, L.M. (2001). ***Tratado de Anestesia y Reanimación.*** España: Aran Ediciones, S.A.

Andral G. (1843). ***Essai d'Hématologie pathologique.*** Paris: Fortin, Masson et Cie Lib.

Ángel, G y Ángel, M. (2006). ***Interpretación Clínica del Laboratorio.*** 7ª Edición Bogotá: Médica Panamericana, S.A.

Arias, J., Aller, M.A., Arias, J.J y Lorente, L. (1999). ***Fisiopatología Quirúrgica Traumatismos, Infecciones, Tumores.*** Madrid: Tébar.

Arias, J., Ángel, M., Arias, J. y Aldanondo, J. (2000). ***Enfermería Médico-Quirúrgica.*** Madrid: Tébar.

Bernadette, R.F. (2004). ***Hematología Fundamentos, y Aplicaciones Clínicas.*** Argentina: Panamericana, S.A.

Brambila, E., Castillo, R y Lozano Zarain, P. III. (2003, 08, 18). ***Comparación Entre Tres Métodos Manuales Empleados en la Cuenta Diferencial de Leucocitos Respecto a un Equipo Automatizado.*** Asociación mexicana de bioquímica clínica, AC. (28), 4.

Brines, J., Crespo, M., Delgado, A., Garagorri, J.M y Ruza, F.J. (1997). ***Manual de Residente de Pediatría y sus Áreas Específicas.*** Madrid: Norma.

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, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones**. 1ª Edición. México: IDRC.

Coulter, W.H. (1956) **High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer” Pro, Natl. Electron. Conf.**, 12: 1034, 1956.

Cruz, A y Camargo, B. (2001). **Glosario de Términos en Parasitología y Ciencias Afines**. México. Plaza y Valdés.

Curtis, E., Schnek, A y Massarini, A. (2008). **Curtis Biología**. Buenos Aires-Argentina: medica panamericana S.A.

De Costa, J y Zamora, M.S. (1993). **Manual de Clases Prácticas de Fisiología Animal**. Universidad de Murcia: Editum.

Del Lusio, F., Abad y García, M. (2007). **Emergencia y Urgencias**. España: Alán Ediciones, S.A.

Donn, A. (1844). **Cours de Microscopie complémentaire**. Paris: Baillié-re.

Faller, A., Schunke, M y Schunke, G. (2006). **Estructura y Función Del Cuerpo Humano**. España: Paldotribo.

Fidalgo, L.E., Rejar, J., De Gupegui, R.R y Ramos, J.J. (2003). **Medica Veterinaria**. Universidad de león, Santiago de compostela y Zaragoza: KADMOS.

Fink, E y Fernández, A. III. (1996, 10, 07). **Evaluación Externa de la Calidad Analítica en Hematología: Una Necesidad en América Latina**. Panam salud pública, (2), 182.

Fox, I.F. (2003). **Fisiología Humana**. 1ª Edición. España: McGraw-Hill/ Interamericana de España, S.A.U.

Freund, M. (2011). Hematología: **Guía Práctica para el Diagnóstico Microscópico**. 11ª Edición. Buenos Aires-Argentina: Médica Panamericana, S.A.

Fuentes, X., Castañeiras, M.J y Queraltó, J.M. (1998). **Bioquímica Clínica y Patología Molecular**. Barcelona: RMEverté, S.A.

Gal, B., López, M., Martín, A.I y Prieto Montalvo, S. (2007). **Bases De La Fisiología**. España: Tébar. 97-98.

García, C y González, A. (2000). **Tratado de Pediatría Social**. Madrid-España: Díaz de Santos, S.A.

García, P. (2002, 19). **Ventajas y problemas de los Métodos Automatizados de Estudio de Susceptividad In vitro**, (2).

Garrido, A., Teijón, J.M., Blanco, D., Villaverde, C., Mendoza, C y Ramírez, R.J. (2006). **Fundamento de Bioquímica Estructural**. 2ª Edición. Madrid: Tébar. S.L.

González, J.M. (2011). **Técnicas y Métodos De Laboratorio Clínico**. 3ª Edición. Barcelona-España: Elsevier España, S.L. 4-6.

Gutiérrez, C. (2004). **Principios de Anatomía, Fisiología e Higiene**. Educación para la salud. México: limusa, S.A de C.V. Grupo noriega.

Guyton, A.C y Hall, J.E. (2006). **Tratado de Fisiología Médica**. Barcelona-España: Editorial Elsevier, S.L. 436-437.

Heredia, M.R. (2004). **Descubra el Poder de las Uvas**. Buenos Aires: Grupo imaginador de ediciones.

House, M. (2001). **Diccionarios Uxford-Complutense Enfermería**. España: Complutense. (pp. 319).

Ingraham, J.L y Ingraham, C.A. (1998). **Introducción a la Microbiología**. España: reverte, 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.

Koolman, J., Rohm, K.H. (2004). **Bioquímica**. Madrid-España: Medica Panamericana, S.A.

Leeson, Leeson, Paparo. (1990). **Histología**. Interamericana

Lynch, Raphael. (1983). **Métodos de laboratorio**. Interamericana

Manascero, A.R. (2003). **Hematología Herramienta para el Diagnóstico: Atlas de morfología celular, alteraciones y enfermedades relacionadas**. Santa fe de Bogotá: Javeriano.

Mcdonald, G.A., Paul, J y Cruickshank, B. (2001). **Atlas de Hematología**. 5ª Edición. Madrid: Médica Pamericana, S.A. 76, 118-141.

Miale, J.M. (1985). **Hematología**, medicina de laboratorio. Barcelona: reverté, S.A.

Muñoz, E.J y García, x. (1998). **Fisiología. Células, Órganos y Sistemas**. México: FCE.

Muñoz, M y Morón, C. (2005). **Manual de Procedimientos de Laboratorio en Técnicas Básicas de Hematología**. Perú: Instituto Nacional de Salud. 29-30

Navarro, R.J. (1999). **Conteo de células sanguíneas a Través de Imágenes de Microscopía**. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalada: división de ciencias básicas e ingeniería.

Nugales, J., Donoso, A y Verdugo, R.J. (2005). **Tratado de Neurología Clínica**. Santiago de Chile: Universitaria S.A.

Núñez, L y Bouda, J. (2007). **Patología Clínica Veterinaria**. 1ª Edición. México: Comité Editorial FMBZ-UNAM. 28-51.

Quevedo, V.A., Martínez, P.Y., Duque, M.J y Mejía, C.J.A. (2004). Fundamentos de pediatría. **El Niño en Estado Crítico**. 1ª Edición. Colombia: CIB.

Rabinovich, G.A. (2004). **Inmunopatología Molecular: Nueva Frontera de la Medicina**. Argentina: Médica Panamericana. S.A.

Reina, A.M y Hernández, R. (2005). **ATS/Di de Atención Especializada del Instituto Catalán de la Salud**. 4ª Edición Alcalá de Guadaíra (Sevilla): MAD, S.L. 74-77.

Requejo, A.M y Ortega, R.M. (2000). **Nutriguia (Manual de Nutrición Clínica en Atención Primaria)**. 1ª Edición Madrid-España: Complutense, S.A.

Rius, J. (2005). **Metodología y Técnicas de Atletismo**. 1ª Edición. Barcelona-España: Paldotribo.

Rodak, F.B. (2005). **Hematología Fundamentos Y Aplicaciones Clínicas**. Buenos Aires: Medica Panamericana, S.A.

Rodríguez, M.C. (1997). **Manual de normas técnicas científicas y administrativas para el laboratorio clínico**. Santa Fe de Bogotá: Ministerio de Salud.

Rodríguez, E., Gamboa, M.M., Hernández, F y García Hidalgo, J.D. (2006). **Bacteriología General: Principios y Prácticas de Laboratorios**. Costa Rica: Universidad de Costa Rica 12-13.

Rodríguez, A., López, N.L., Quintero, H.E y Canal, R.L. (2009). **Ciencia, Tecnología y Ambiente**. 3era Edición. España: Cengage Learning.

Roitt, I.M., (2008). **Inmunología**. Buenos Aires Argentina: Médica Panamericana.

Rojas, W. (2004). **Inmunología**. 13ª Edición. Colombia: CIB.

Ross, M.H y Pawlina, W. (2007). **Histología Texto y Atlas**. 5ª Edición Argentina: Médica Panamericana S.A. 280-281, 303.

Rubio, F., García, B y Carrasco, M. (2004). **Fundamentos y Técnicas de Análisis Hematológicos y Citológicos**. España: Paraninfo, S.A.

Ruiz, S., Cuy, P., Pellicer, M.T y Ramírez, A. (1995). **Manual de Prácticas de Fisiología Animal Veterinaria**. San francisco universidad de Murcia: Editum. (pp. 29).

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.

Senac JB. (1749). **Traité de la structure du Coeur, de ses action, et de ses maladies.** Paris: Briasson.

Serway, R.A y faughn, J.S. (2001). **Física.** 5ta Edición. México: Pearson Educación de México: S.A de C.V.

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.

Starr, c y Taggart, r. (2008). Biología. **La Unidad y la Diversidad de la Vida.** México: Cengage Learning editores S.A de C.V.

Steven, A y Lowe, J. (2001). **Anatomía y Patología.** 2ª Edición. Madrid-España: Hancourt, S.A.

Thews, G., Mutschler, E y Vaupel, P. (1983). **Anatomía, Fisiología y Patología del Hombre.** Barcelona: Reverte, S.A.

Tresgüerras, J., Vilanova Bernés, M. y Lopez Callejón, J. (2009). **Anatomía y Fisiología del Cuerpo Humano.** España-Madrid: McGraw-Hill/ Interamericana e España, S.A.U.

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

Vives, J.L y Aguilar, J.L. (2006). **Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematología. Barcelona.** (España): Masson, S.A.

Welsch, U. (2010). **Histología.** 2ª Edición. Buenos Aires-Madrid: Medica Panamericana, S.A. (pp. 210-217).

Weil E y Bloch M. (1934). **Enfermedades de la sangre y de los órganos hematopoyéticos.** En: Bezancon F, Labbé M, Bernard L, et al.

Tratado de Patología Médica. Barcelona: Editorial Pubul (pp. 16-29).

Wilmore, H. J y Costill, D.L. (2007). **Fisiología del Esfuerzo y del Deporte.** 6ª Edición. Barcelona: Paldotribo.

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](http://www.bdigital.ula.ve)

ANEXOS

[www,bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

Anexo 1. Pipetas Automáticas



Fuente: Márquez P. Neyla Y. (2016)

www.bdigital.ula.ve

Anexo 2. Líquido de Türk



Fuente: Márquez P. Neyla Y. (2016)

Anexo 3. Cámara de Neubauer



Fuente: Márquez P. Neyla Y. (2016)

www.bdigital.ula.ve

Anexo 4. Microscopio



Fuente: Márquez P. Neyla Y. (2016)

