

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

**DETERMINACIONES HEMATOLOGICAS
POR TECNICAS AUTOMATICAS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER
EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
LUZ MARIA DE LA PAZ MONTES DE OCA Y CONTRERAS



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CLAS TESIS 1928
ABO M. E. ~~110~~ 291
FECHA _____
PROC _____
• _____



JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: OSCAR AMOR DODERO
VOCAL: MA. ELENA BUSTAMANTE CALVILLO
SECRETARIO: PATRICIA ALVAREZ ROMERO
1er. SUPLENTE: CLEMENTINA BELAUNZARAN
2o. SUPLENTE: LOURDES IRIGOYEN CORIA

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

DEPTO. DE HEMATOLOGIA DEL LABORATORIO DE
ANALISIS CLINICOS DEL C.H. 20 DE NOVIEMBRE.

SUSTENTANTE: LUZ MA. PAZ MONTES DE OCA Y CONTRERAS
ASESOR: PATRICIA ALVAREZ ROMERO
SUPERVISOR TECNICO: BEATRIZ GOMEZ HERNANDEZ

A mis padres con mi amor, respeto y reconocimiento por cuanto me han dado.

A mis hermanos, que me apoyan a cada momento.

A Roberto.

A la Maestra Q.F.B. Patricia Alvarez Romero
por su valiosa y desinteresada ayuda para con-
cluir este trabajo.

A la memoria del maestro Q.F.B. Ramón
Guevara E. por cuanto me ayudó siempre.

A la Sra. Q.F.B. Beatríz Gómez de Martínez,
por su asesoría.

A Todas y cada una de mis compañeras del Depto. de Hematología
del Laboratorio de Análisis Clínicos del C.H. 20 de Noviembre --
por sus inapreciables consejos.

A todos mis amigos,

I N D I C E

I	INTRODUCCION.	1
II	GENERALIDADES.	4
III	DESCRIPCION DE LOS APARATOS.	11
IV	MATERIAL Y METODOS.	24
V	ESQUEMAS.	36
VI	RESULTADOS.	46
VII	DISCUSION.	59
VIII	CONCLUSIONES.	61
IX	BIBLIOGRAFIA.	65

I INTRODUCCION

Día a día, se ha incrementado la necesidad de realizar un número mayor de análisis clínicos en forma rutinaria en los centros de trabajo, por lo que se ha hecho evidente la necesidad de adoptar instrumentación sencilla que tienda a simplificar el trabajo, disminuir el tiempo en que se efectúan las determinaciones y tipificar el índice de error, tratando siempre de que las pruebas resulten económicas. En ningún momento ha de olvidarse que la calidad de estas determinaciones es lo que debe inquietar a los responsables de efectuar dichos estudios ya que, de otro modo, de nada sirve que la capacidad del autoanizador o del personal que lo maneja sea muy elevada en cuanto al número de muestras que pueden procesarse diariamente y que se descuide la calidad de las determinaciones, precisamente este es el motivo por el cual se hizo este trabajo, es decir; establecer la calidad de las citologías hemáticas realizadas en forma automatizada, pues siendo el nuestro un centro hospitalario con una gran afluencia de gente, es necesario procesar un gran número de muestras diariamente, y debemos tener la seguridad de que los resultados que se reporten estén dentro de un margen de error aceptable.

En el departamento de Hematología existen dos autoanizadores disponibles para hacer las determinaciones que corresponden

a citologías hemáticas: uno de estos, el Technicon SMA 7A, es uno de los más usados actualmente en los laboratorios de análisis clínicos mexicanos. El otro, es el Contador Coulter Modelo S. Ambos proporcionan los siguientes datos: número de eritrocitos, número de leucocitos, hematocrito, hemoglobina e índices eritrocíticos.

II GENERALIDADES

En los últimos cuarenta años, los laboratorios de análisis clínicos han tratado primero, de encontrar técnicas útiles y reproducibles para determinar parámetros tan importantes como: el hematocrito, hemoglobina, recuento de eritrocitos y leucocitos e índices corpusculares; y después, han tratado de mejorar las técnicas ya establecidas.

Algunos autores en el período de 1860 a 1870 valoraron la cantidad de eritrocitos, pero sus primeros intentos de expresar la relación media de éstos fué el índice de color propuesto por Hayem en 1878. Después de la introducción del hematocrito, se estableció el índice de volúmen, Capps, 1903, relacionando al hematocrito con el número de glóbulos rojos; el tercer índice encontrado fué el de saturación, calculado por Hayem en 1923 (28), relacionando hemoglobina y hematocrito, todos estos índices se comparaban con valores arbitrariamente tomados como "normales", en vista de esto, los valores "normales" fueron proporcionados por Graham y Norgard en el año de 1923 (36), generalizando como valores normales los obtenidos por ellos y aplicándolos a cualquier persona, lo cual es incorrecto pues varían dichos valores con la edad, sexo y una serie de factores físicos y ecológicos que no fueron tomados en cuenta; y tal vez por esto mismo, fueron poco empleadas estas constantes; Levinson 1964 (51), y Haden, 1935 (39).

Actualmente los índices eritrocíticos nombrados por Wintrobe en 1932 (83) como constantes corpusculares, para distinguirlos como valores absolutos; fueron calculados a través de sus trabajos publicados entre 1929 y 1934 (del 79 al 85), y estableció el rango de valores para volúmen globular medio, concentración de hemoglobina corpuscular, y concentración de hemoglobina corpuscular media, mismo autor, 1934 (85).

En lo que a recuento de eritrocitos se refiere, puede presumirse que todos los investigadores realizaron algún tipo de conteo en cámara, inventada por Cramer en 1855, con retículo en el ocular del microscopio, modificado por Alferon en 1884, usando cubreobjetos suelto. Grovers en 1897 puso la retícula en la cámara y así hasta llegar a la cámara de Neubauer, Plum 1936 (65), empleada actualmente y recomendada por el Depto. Nacional de Normas de U.S.A. Otros investigadores como Magath 1936 (54) y Tompkins (75), prepararon reactivos que sirven para diluir la sangre usando pipetas especiales para ello (como la pipeta de Thoma), Haden en 1935 (39) estableció el valor por el cual debe multiplicarse el número de eritrocitos, y el error existente en estos recuentos lo determinó Berkson et. al. 1940 (8), por último Biggs, et. al. en 1948 (9) indicó el error mínimo probable en el conteo hecho por un técnico hábil como de 7.8% aproximadamente. Hay otros métodos como el

de difracción, Ponder 1948 (87), o fotoeléctricos como el de Blum 1945 y 1956 (11 y 12) y el de Brackett y col. 1953 (13), pero estas técnicas no son prácticas para uso rutinario.

La determinación del hematocrito descrito por Hedin, y Blix en 1890, no tuvo ninguna importancia; en 1891 Dalann (22) lo obtenía con dos tubos capilares graduados, y con una centrífuga de operador manual, por lo que resultaba difícil su establecimiento. Wintrobe en 1929 (7), fué realmente el primero en describir una técnica adecuada para determinarlo y estandarizar el método, usando un factor de corrección necesario por el anticoagulante que usaba pues alteraba el volúmen celular dando un porcentaje de error de 8.2%, 1934 (85). Ahora ha sido mejorado notablemente por el uso de anticoagulantes que no alteran el volúmen celular, y se han ideado también micrométodos, experimentados por muchos autores. De todas estas microtécnicas, la más recomendada es la desarrollada por Strumia, en 1954 (73), que da un error casi nulo pues hay una mejor sedimentación de los eritrocitos en un menor tiempo de centrifugación. Lampasso, 1965 (48).

La cuantificación de hemoglobina es una de las pruebas más solicitadas, y por lo tanto, se han ideado toda clase de técnicas. Su determinación se hacía basándose en la producción de color -

apreciado a ojo y comparando con un color patrón tomado como 100 %, y dando los resultados en % de hemoglobina. El método de la hematina ácida propuesto por Sahli, en 1895, citado por Wintrobe 1961 (87), compara la hematina ácida producida en una muestra, con una solución patrón de la misma, equivalente a 17.3 gr % de hemoglobina en la escala de Sahli, esta técnica no es exacta. Levinson 1964 (51). La técnica de la hematina alcalina, Wu 1922 (89), es más recomendable que la anterior porque casi todas las formas de hemoglobina pasan a hematina en este pH, cosa que no ocurre en medio ácido. Técnicas como la de Sandford, Sheard y Osterberg 1929, miden la capacidad de combinación de la sangre con el oxígeno; aquí no se necesita igualar ni comparar colores, por lo que se evitan errores subjetivos. El método de Peters y Van Slyke, 1932 (63), se basa en la producción de color por la formación de oxihemoglobina; fué modificado por Evelyn y Malloy en 1938 (31). Muchos otros investigadores han ideado técnicas principalmente fotocolorimétricas para cuantear la hemoglobina de una muestra. Y hay métodos inmunológicos como la electroforesis, Sheena y col., 1968 (72 B), que es una prueba magnífica para buscar hemoglobinas anormales y hemoglobina A₂.

El método de elección es el de la cianometahemoglobina de Crosby, desarrollado en 1954 (20); y el uso de soluciones certificadas como patrones han sido recomendadas por la División de Ciencias Médicas de la Academia Nacional de Ciencias; Drabkin 1949 (27).

Ahora bien, los leucocitos se determinaron al igual que se hizo con los eritrocitos, Levinson 1964 (51), es decir, ensayando diferentes cámaras y dispositivos, hasta llegar al método actual, usando para diluir la sangre pipetas especiales, en un líquido que rompe a los glóbulos rojos, pero que no altera a los leucocitos.- Helman, et. al., 1972 (44).

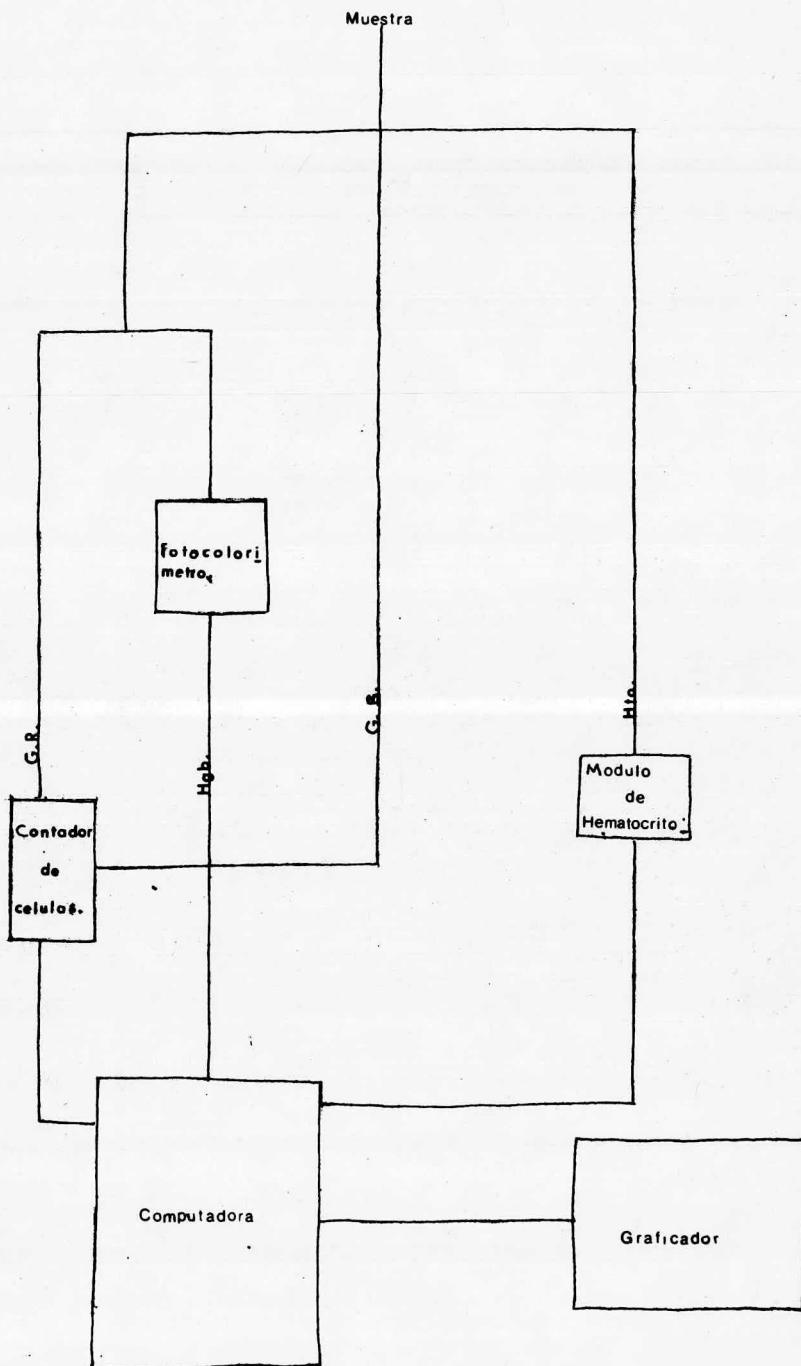
Los métodos han cambiado con el advenimiento de la instrumentación y así las células rojas y blancas de la sangre pueden contarse en un campo oscuro, detectando a las células en un área visible como en Technicon, Mansberg 1969 (57). El aparato de Sanborn - Fromer mide el promedio de células en un volumen dado por unidad de tiempo; el autocitómetro de Fisher tiene este mismo principio; pero cuenta las células (no su promedio), por volumen específico, Brackett 1953 (13). El contador Coulter, se basa en que las células blancas y rojas de la sangre son pobres conductores eléctricos en comparación con el medio en que están

diluidas; Coulter 1956 (19).

La forma en que se mide la hemoglobina en los aparatos es usando el método de la cianometahemoglobina, y esta lectura se hace en forma directa. El technicon hace el hematocrito por -- conductancia eléctrica, y el contador Coulter por computación, o sea indirectamente.

III DESCRIPCION DE LOS APARATOS

TECHNICON SMA 7A: Diagrama de Funcionamiento.



TECHNICON SMA 7A.

Los análisis por flujo continuo son la base del funcionamiento de este aparato, las muestras pasan una por una a través de un sistema de tubos donde se diluyen o combinan con reactivos para efectuar las pruebas que nos interesan, además de que controlan las condiciones en que se llevan a cabo las mismas. (57).

El Technicon SMA 7A consta de siete unidades modulares, y son:

- 1) Muestreador Automático
- 2) Bomba Alimentadora
- 3) Módulo de Hematocrito
- 4) Colorímetro
- 5) Contador de células
- 6) Computadora
- 7) Gratificador

Cada módulo realiza automáticamente una función analítica - diferente, con una velocidad de 60 muestras por hora, o bien 420 operaciones en este tiempo.

El muestreador automático proporciona muestras al sistema; consta de un disco con capacidad para cuarenta muestras, ya sea

sangre, patrones o soluciones de lavado; también de dos agitadores fijos al muestreador, con movimientos rotatorios y que llevan un recubrimiento de teflón para evitar que la muestra se adhiera a ellos, Ardsleey, 1966 (5). Este módulo se encuentra conectado a la bomba alimentadora, que aspira las muestras con una pipeta tabular metálica, después se levanta y toma aire aproximadamente por espacio de 12 segundos, se introduce luego a un recipiente con solución salina 0.85 %, tomando una cantidad para lavado, otra vez toma aire, y así sucesivamente con todas las muestras. Esta combinación de burbujas de aire y solución de lavado dentro del sistema forma una barrera aislante entre muestra y muestra, eliminando así el contacto que causaría contaminación y lecturas erróneas, (57).

La bomba alimentadora está formada por tuberías, accesorios y serpentines que proporcionan y mezclan ya sea muestras, reactivos o aire y los hace circular dentro del sistema. Gracias a esto se distribuyen las cantidades necesarias de los reactivos para hacer las determinaciones deseadas. La cantidad de sangre completa y anticoagulada que se requiere para hacer una citología hemática con 7 determinaciones es aproximadamente de 1 ml. -- que se divide en tres porciones, para efectuar pruebas diferentes. (57). El primer tubo recibe 0.05 ml. de la muestra para contar el

número de glóbulos rojos y la concentración de hemoglobina y se mezcla automáticamente con solución salina 0.9 ‰, Allen 1960. 1961 (2 y 3); hasta una dilución de 1:100, que se subdivide, 0.04 ml. se diluyen de nuevo con salina 0.9 ‰, quedando así una dilución final de 1:10,000, Feichmeir, et. al. 1961 (32), y pasa por el serpentín hacia el contador de células (Esquema No. 1), éste es de campo oscuro y cuenta a las partículas que pasan a través de una luz seleccionada (área visible), por lo que cada célula que pasa produce pulsaciones eléctricas visibles en la pantalla de un osciloscopio que se encuentra en este contador. A mayor número de células, mayor voltaje, magath y col. 1960 (55).

La segunda parte de la primera dilución (1:100) pasa a -- otro tubo donde se combina con reactivo de Drabkin modificado; Price - Jones 1965 (67), esta mezcla se envía a una lámpara - sensibilizadora, que aumenta la velocidad de reacción; y de - aquí pasa al colorímetro, en donde la cantidad de hemoglobina - es leída ópticamente en iguales condiciones a un patrón, Sunderman, 1953 (74 y 57). La concentración de hemoglobina de la -- muestra está en relación directa con la variación en la intensidad de color producida por la reacción, Gradwohl, 1963 (35).

Regresando a la línea inicial; por la segunda línea pasan aproximadamente 0.1 ml. de sangre completa que se diluye ahora con cetrimida 1:40, para que se lisen los eritrocitos y plaquetas, Eastham 1965 (39). Los leucocitos en dilución viajan hacia el contador de células (Esquema No. 1), donde se cuentan de igual manera que los eritrocitos, Berkson 1940 (8), Akeroyd, 1959 (1), y Mansberg 1969 referido en (57).

La tercera parte en que se subdivide la muestra, sirve para la determinación del hematocrito, Hattersley y Ragusa, 1967 (42); esta línea aspira 0.23 ml. de sangre. Y el hematocrito se establece por conductancia eléctrica, ya que los eritrocitos no son conductores eléctricos y el plasma si lo es, Kerner, et. al., 1961 (47). Un volumen bajo de células da como consecuencia una alta conductividad eléctrica y viceversa; dicho de otro modo, a mayor columna de células, mayor será la resistencia eléctrica; Grandwol 1963 (35), Ukada et. al. 1960 (61).

Todos estos parámetros obtenidos en forma directa, son enviados en forma de voltajes a la unidad computadora, (Esquema No. 2), en donde se relacionan para obtener los índices eritrocíticos, usando las fórmulas establecidas por Wintrobe 1961, (87) y Hattersley 1967 (42).

Esta relación es la siguiente:

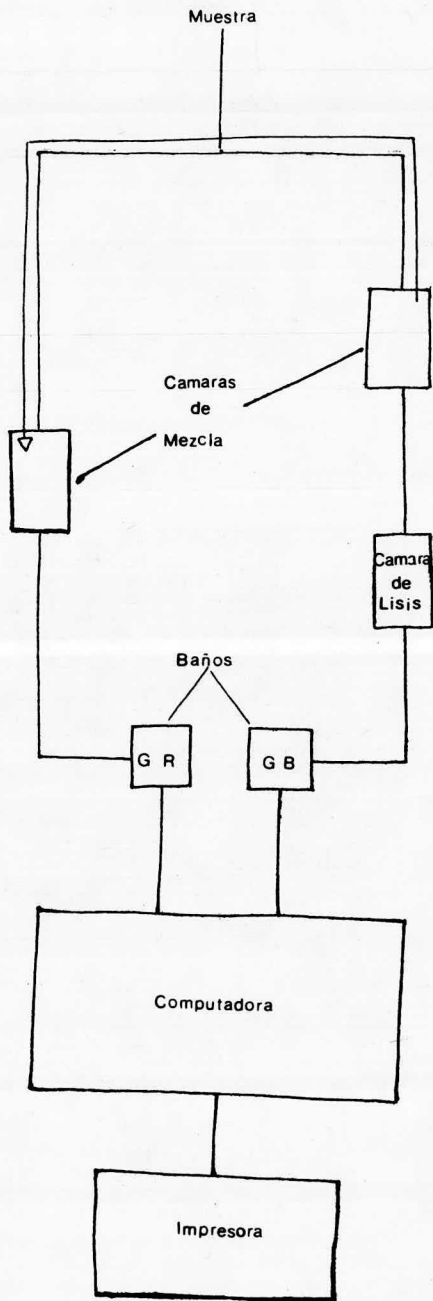
$$V.G.M. = \frac{\text{Hematocrito } \%}{\text{Cuenta de eritrocitos } / \text{mm}^3}$$

$$H.C.M. = \frac{\text{Hemoglobina gr. } \%}{\text{Cuenta de eritrocitos } / \text{mm}^3}$$

$$C.H.C.M. = \frac{\text{Hemoglobina gr. } \%}{\text{Hematocrito } \%}$$

Ya habiendo obtenido los valores correspondientes a los - siete parámetros, la información todavía en forma de voltajes, pasa al registrador de datos, (Esquema No. 3), y se va formando una hemografía que es la representación gráfica de los valores - encontrados para cada muestra.

COULTER MODELO S : Diagrama de Funcionamiento.



CONTADOR COULTER MODELO "S"

Utiliza el sistema de contar y medir muestras, una a una, con un sistema dilutor automático efectuando la medición de los mismos parámetros que el otro autoanalizador a que nos referimos. El análisis completo de éstos se efectúa en 40 segundos - (cada 20 segundos puede introducirse otra muestra), coordinando el envío de sangres, reactivos, etc., para efectuar las pruebas de manera conveniente y en el momento en que se necesita.(56).

Este modelo de Coulter consta de cinco unidades físicamente separadas entre sí pero internamente conectadas; y son:

- 1) Fuente de Energía Neumática
- 2) Fuente de Energía Eléctrica
- 3) Unidad Dilutora
- 4) Unidad Analizadora o Computadora y,
- 5) Unidad Impresora.

La fuente de energía neumática (Esquema No. 5, está formada por una combinación de bomba de vacío y de válvulas reguladoras de aire. La primera proporciona las presiones para que el aparato funcione, y cuente células y las válvulas de aire son usadas

para mezclar, aspirar, pipetear, diluir, transferir muestras y lavar el aparato.

La fuente de energía eléctrica (Esquema No. 6), proporciona toda la electricidad que necesita el sistema; éste contiene muchas tarjetas de circuito, que reciben información en forma de voltaje - desde las unidades dilutora y analizadora, y de aquí pasa la información a la impresora. (56).

En la unidad dilutora mostrada en el Esquema No. 4; la muestra se aspira, diluye, mezcla, lisa y es analizada. Tiene un aspirador principal que es activado haciendo presión en la barra de control, (que nos indica con una luz verde cuando el aparato puede aceptar una muestra y con una luz roja cuando se ha tomado la cantidad de muestra necesaria), al hacer esto, se inicia el proceso y todos los pasos siguientes son automáticos. El aspirador toma 1 ml. de sangre, que pasa a la válvula medidora que mide exactamente 44.7λ de sangre y la manda a una cámara (A-1) que está a la derecha del aparato, junto con 10 ml. de diluyente, D'Angelo et. al., 1962 (23) y Allen y col. 1961 (3), quedando así hecha la primera dilución (1:224); se mezcla con burbujas de aire, pasa a otra cámara (B-1), aquí se toma una alícuota de la dilución y se manda de nuevo a la válvula medidora para efectuar

otras determinaciones, y la parte restante (9 ml.), quedan en la cámara B-1 de donde pasan a otra que se llama lisadora, aquí se mezcla con 1 ml. de reactivo LYSSES (que es una mezcla de detergente y reactivo de Drabkin modificado), Hatch y Balazs, 1961 (41), dando una dilución de 1:250). La suspensión de células está en la cámara de lisis sólo el tiempo suficiente para lisar a los eritrocitos y para que la hemoglobina pase a cianometahemoglobina; Willoughby, 1961 (78). Después ésta pasa al baño de los leucocitos, que consta de una cubeta de cristal que intercontiene tres tubos también de cristal, cada uno de ellos con una abertura de 100 micras de diámetro, un electrodo interno y otro externo a estos tubos. Al llegar la muestra al baño, se hace el recuento de glóbulos blancos, usando el "Principio Coulter"; Coulter, 1956 (19); el cual se basa en hacer pasar una corriente eléctrica y vacío a través de una abertura; cada vez que por efecto del vacío una célula pasa por el orificio, disminuye la conductividad del electrolito entre los electrodos, y aparece un impulso cuya amplitud es proporcional al volumen de la célula. Feichtmeir, et. al. 1961 (32). Es decir, las células desplazan un valor equivalente a ellas de electrolito, por lo que la resistencia al flujo de corriente aumenta, variando así el voltaje y el número de cambios es proporcional al número de células. Los

impulsos de voltaje se amplifican y observan como picos en un osciloscopio, se hacen las cuentas por triplicado, Carl y - - Mattern 1957 (16), Croslan et. al. 1958 (21) y Gagon y col. 1966 (33).

Para hacer el recuento de eritrocitos, Anderson, 1961 (4); cuando la primera dilución (1:224) está en la cámara B-1, se toma una alícuota de 1 ml., y se manda de nuevo a la válvula medidora, que mide 44. λ de la dilución y los envía junto con 10 ml. de diluyente a una cámara colocada del lado izquierdo (A-2), - llegando a una dilución final de 1:50,000; pasa a la cámara B-2 en donde se mezcla con burbujas de aire, y de aquí pasa al ba-ño de los eritrocitos, donde se cuentan los globulos rojos, de igual manera que se cuentan los leucocitos y en forma simultá-nea, Brecher, et. al., 1956 (14).

Para obtener el volúmen globular medio, Hatterley y Ragusa 1967 (42), se utilizan los impulsos que producen las células - rojas al pasar por las aberturas (cada célula representa un pico), éstos son amplificados en la pantalla de un osciloscopio que se encuentra en la unidad analizadora, y que se observan como pi-cos verticales. El tamaño relativo de las células es proporcio-nal a la altura de los picos, Grant, 1960 (37).

La hemoglobina liberada al lisarse los eritrocitos se combina con reactivo de Drabkin modificado, Price - Jones 1965 (67) y permanece en la cámara de lisis mientras se enjuaga el baño de leucocitos con diluyente y se hace una lectura electrónica de hemoglobina que se toma como blanco. Inmediatamente después pasa la dilución al baño donde se lee la cantidad de hemoglobina con una cámara fotoeléctrica colocada detrás de dicho baño; Allen y Algird 1960 (2), Allen y Gudaitis, 1961 (3).

La unidad analizadora, (figura No. 7), forma parte del sistema electrónico y recibe un suministro de señales en forma de voltaje enviados a ésta por la unidad dilutora y que son los resultados obtenidos en forma directa. Está formada por tarjetas de circuito, dos osciloscopios, uno para globulos rojos y otro para blancos; luces de rechazo que se encienden si dos o más lecturas discrepan entre sí más de un 4% (ya que la cuenta de globulos se hace por triplicado y el volúmen globular medio por duplicado) y de un cerebro que partiendo de los resultados recibidos calcula los otros parámetros de la forma siguiente:

$$\text{Hematocrito} = V G M / G.R.$$

$$M C H = \text{Hgb} / G.R.$$

$$M C H C = \text{Hgb} / \text{Hto.}$$

Toda la información acumulada por el aparato se traduce de datos análogos a dígitos en la unidad de energía eléctrica, - que también proporciona número de prueba y fecha; y se envían los valores directamente a la unidad impresora (figura No. 8), que los imprime sobre una tarjeta especial, dando los resultados en las unidades adecuadas para cada lectura; Barnard 1969 (6).

IV MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO.

Se tomaron al azar 500 muestras de sangre anticoagulada con la sal trisódica de E D T A, de pacientes que acudieron al C.H. 20 de Noviembre es decir, sin importar sexo, edad, complejión y estado de salud.

MATERIAL.

1. - Autoanalizador Technicon SMA 7A
2. - Contador Coulter Modelo S.
3. - Pipetas de Thoma para glóbulos rojos
4. - Pipetas de Thoma para glóbulos blancos.
5. - Cámara de Neubauer.
6. - Cubrehematímetros.
7. - Agitador de pipetas.
8. - Microscopio óptico Leitz.
9. - Microcentrífuga Internacional.
10. - Tubos capilares de vidrio.
11. - Lámpara de alcohol.
12. - Medidor de microhematocritos.
13. - Pipetas de Sahli.
14. - Tubos de vidrio de 13 x 100.

15. - Fotoceldas.

16. - Fotocolorímetro Leitz modelo M.

SOLUCIONES EMPLEADAS.

1. - Solución de Hayem.

2. - Líquido de Türk.

3. - Reactivo de Drabkin.

4. - Solución salina 0.9 %.

5. - Ceftriaxona.

6. - Reactivo de Drabkin modificado.

7. - Solución salina 0.85 %.

8. - ISOTON.

9. - ISOTERGE.

10. - Control comercial 4C

11. - LYSES.

TECNICAS.

a) Manuales

a.1) Recuento de eritrocitos.

Para saber el número de eritrocitos que hay en una muestra, se hace una dilución de ésta 1:200 v / v con líquido de Hayem. - Tompkins 1948 (75), usando una pipeta de Thoma para glóbulos --

rojos y cuidando de que la dilución sea lo más exacta posible, se mezcla por unos minutos, usando para esto un agitador de pipetas. Una gota de esta dilución se coloca en una cámara de Neubauer, Plum 1936 (65), desechando antes las primeras gotas, se deja reposar 1 ó 2 minutos, y se procede a contar las células en el microscopio, Ch'u 1938 (17); y utilizando el objetivo a seco fuerte. Se cuentan las células que se encuentran en 5 cuadros del área reticulada central de la cámara, formados cada uno de 16 cuadros más pequeños, Levinson 1964 (51).

La fórmula general usada es:

$$\text{G.R./mm}^3 = \text{cuenta} \times \text{factor de espesor} \times \text{factor de área} \\ \times \text{factor de dilución.}$$

$$\text{G.R./mm}^3 = \text{cuenta} \times 10 \times 200; \text{ ó bien}$$

$$\text{G.R./mm}^3 = \text{cuenta} \times 10,000$$

a. 2) Recuento de Leucocitos.

Para establecer el número de leucocitos de una muestra, se procede de manera similar que para la cuenta de eritrocitos, Mia le 1958 (59), pero con una pipeta de Thoma para glóbulos blancos y haciendo una dilución 1:20 v/v de sangre y líquido de Türk, Hel- man, et. al., 1972 (44). Se agita, se desechan las primeras gotas

y se pone la siguiente en la cámara de Neubauer; se deja reposar unos minutos y se cuentan las células que estén en cuatro cuadrados grandes del retículo de la cámara (generalmente se utilizan los cuadrados de las esquinas), con un microscopio óptico.

La fórmula general usada es:

$$\text{G.B./mm}^3 = \text{cuenta} \times \text{fac. espesor} \times \text{fac. área} \times \text{fac. dilución}.$$

$$\text{G.B./mm}^3 = \text{cuenta} \times 10 \times \frac{1}{4} \times 20, \text{ ó}$$

$$\text{G.B./mm}^3 = \text{cuenta} \times 50$$

a.3) Microhematocrito.

El valor del hematocrito se obtuvo usando el micrométodo de Strumia 1954 (73). Se pone sangre en los tubos capilares hasta un poco más de la mitad de éstos, se sella un extremo a la flama de una lámpara de alcohol, cuidando de que no se formen burbujas en el tubo; se centrifugan a 3,000 r.p.m., que da un volúmen constante de paquete celular de 3 a 5 minutos. La manera más fácil y adecuada de leer los microhematocritos es con un medidor sencillo especialmente diseñado para este fin, Johnson 1957 (46).

a.4. Hemoglobina.

El método que se usó para obtener la cantidad de hemoglobina en gr. % de una muestra, es el de la cianometahemoglobina, - Drabkin 1949 (27) y Crosby 1954 (20). Con una pipeta de Sahli, se miden exactamente 0.02 ml. de sangre completa y se mezclan con 5 ml. de reactivo de Drabkin; se agita bien y se deja reposar de 3 a 5 minutos, para que se desarrolle color, que se mide espectrofotométricamente usando una longitud de onda de 540 milimicras; y usando como blanco dicho reactivo; Sunderman y col. 1953 (74).

FORMULAS DE LAS SOLUCIONES EMPLEADAS EN LAS TECNICAS MANUALES.

SOLUCION DE HAYEM.

HgCl_2 0.5 gr.

$\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 5.0 gr.

NaCl 1.0 gr.

Agua destilada C.B.P. 200.0 ml.

LIQUIDO DE TURK

Acido acético glacial 2.0 ml.

Violeta de genciana 1% 1.0 ml.

Agua destilada C.B.P. 100.0 ml.

REACTIVO DE DRABKIN.

NaHCO_3 1.0 gr.

KCN. 0.052 gr.

$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0.198 gr.

Agua destilada C.B.P. 1000.0 ml.

b) Con Aparatos.

Las técnicas que se siguen en cada uno de los autoanalizadores ya han sido descritas en el capítulo anterior; por lo tanto, aquí solamente se mencionarán los reactivos que éstos necesitan para efectuar una citología hemática.

b.1. Technicon SMA 7A.

b.1.1. Recuento de Eritrocitos.

El cloruro de sodio 0.9% es el reactivo que se usa para el

conteo de eritrocitos, ya que con éste, el aparato efectúa las diluciones de sangre, que en este caso hace posible el conteo de glóbulos rojos, aunque también interviene para hacer la dilución para el conteo de glóbulos blancos, y la primera dilución para hemoglobina; Blum, L.L. 1945 (11 y 12) y Brakett 1953 (13).

b.1.2. Recuento de Leucocitos.

La solución de cetrimida es el reactivo usado para determinar el número de leucocitos de cada muestra; este reactivo es un detergente suave, que actúa sobre las membranas de los eritrocitos provocando estromatólisis, Richar, 1959 (69), D'Angelo - 1964 (24).

b.1.3. Hemoglobina.

Para que el autoanalizador mida la cantidad de hemoglobina de la muestra, es necesario que ésta se combine con reactivo de Drabkin modificado y se transforme a cianometahemoglobina, que es un compuesto colorido y puede leerse en el colorímetro del autoanalizador, Drabkin 1949 (27), Wintrobe 1961 (87).

Para mantener limpio el aparato utilizamos solución salina 0.85%, la cual sirve como solución de lavado y aislante entre muestra y muestra.

FORMULAS DE LAS SOLUCIONES EMPLEADAS POR EL AUTO-ANALIZADOR SMA 7A DE TECHNICON.

CLORURO DE SODIO 0.9%

NaCl 9 gr.

Agua destilada C.B.P. 1000 ml.

SOLUCION DE CETRIMIDA.

Cetrimida 5 gr.

NaCl 9 gr.

Formaldehido 40%. 1 ml.

Ac. Acético glacial 5 ml.

Agua destilada C.B.P. 1000 ml.

REACTIVO DE DRABKIN MODIFICADO.

NaHCO_3 4.8 gr.

KCN 4.8 gr.

$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0.6 gr.

Agua destilada C.B.P. 1000.0 ml.

SOLUCION SALINA 0.85 %

NaCl 8.5 gr.

Agua destilada C.B.P.1000.0 ml.

b.2. Contador Coulter modelo S

b.2.1. ISOTON

Es un reactivo que tiene varios proósitos; como su nombre lo indica es una solución que proporciona el medio ideal, por ser buen conductor de la electricidad, para efectuar los recuentos celulares, diluye las muestras, sirve para hacer la cuenta de fondo después - de lavar y antes de calibrar el aparato; también se usa para hacer diluciones manuales de las muestras escasas y, lo que es muy importante, es el blanco para poder efectuar la detrrminación de hemoglobina; D'Angelo, 1962 (23), Anderson P., 1961 (4).

b.2.2. LYSESSES.

Es una mezcla de agente lisante de glóbulos rojos (detergente suave), y reactivo de Drabkin modificado, por lo que sirve al - hacer las determinaciones de número de glóbulos blancos y hemoglobina de cada muestra, Willoughby, 1961 (78), Allen, 1960 (2),

b.2.3. CONTROL COMERCIAL 4C.

Se usa este control comercial para calibrar el autoanali-
zador diariamente; basta con que se haga esto una vez al día -
después de realizar la cuenta de fondo y antes de pasar las -
muestras. En la literatura proporcionada por Coulter, Geoffrey
1969 (34), se informa que es sangre humana completa, fresca,
modificada y adicionada de conservadores para que tenga una
duración de 30 días, Dutra, 1966 (29).

b.2.4. ISOTERGE.

Este reactivo sirve para mantener limpio el aparato, se u-
tiliza al finalizar el día de trabajo, y se deja hasta el día siguient
te, cuando se lava y pone en condiciones de trabajo, es un deterg
gente preparado especialmente para lavar y conservar el autoanal
izador (56).

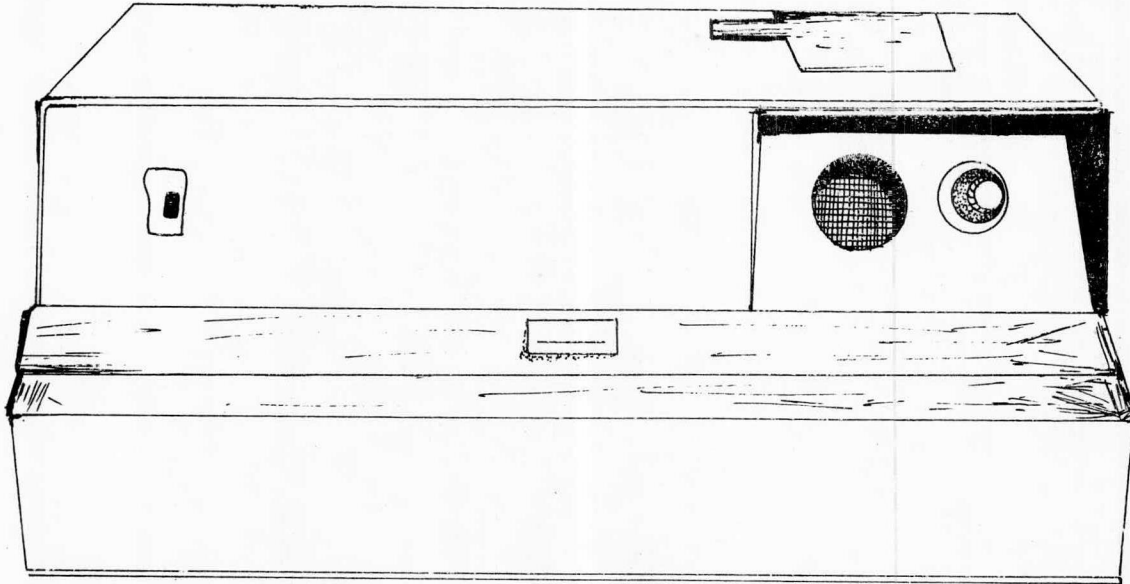
Las fórmulas de estos reactivos no se proporcionan, pues
están patentadas.

V E S Q U E M A S

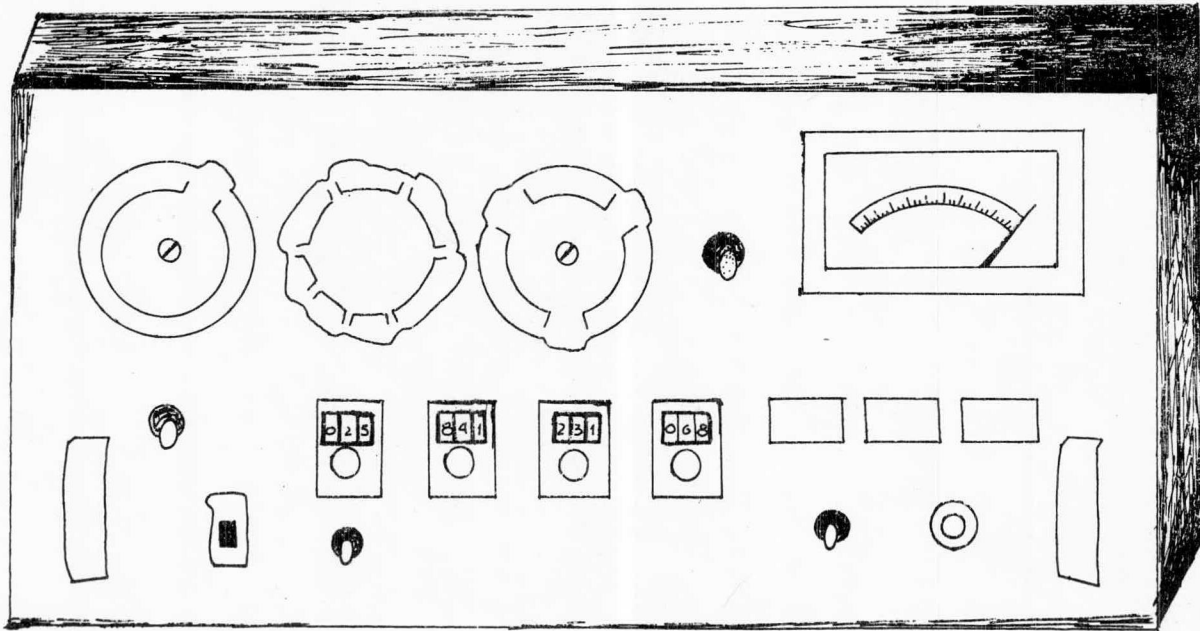
TECHNICON

SMA 7A

Num. 1

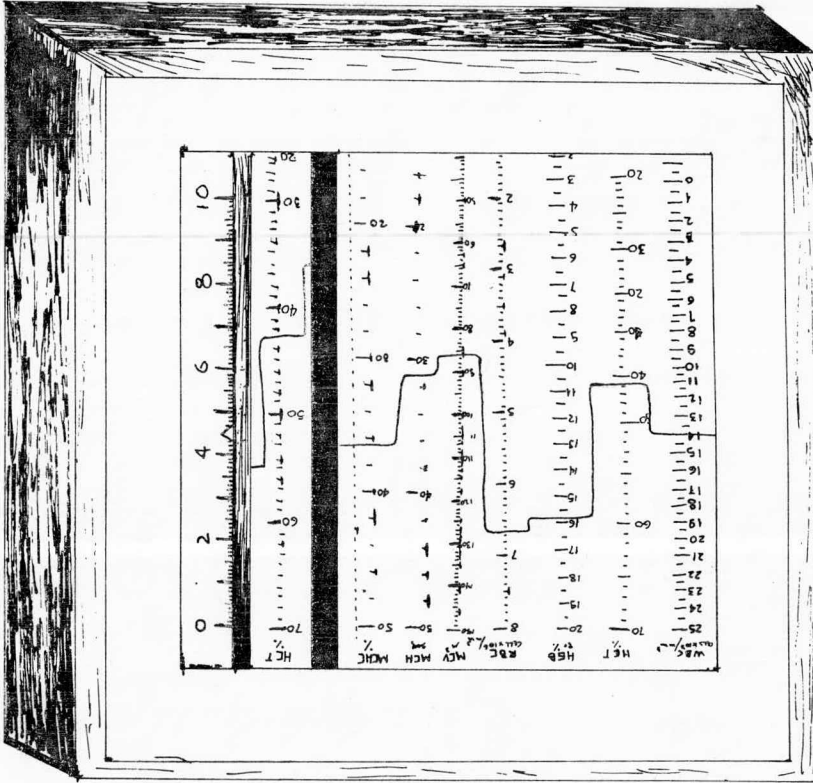


CONTADOR DE CELULAS



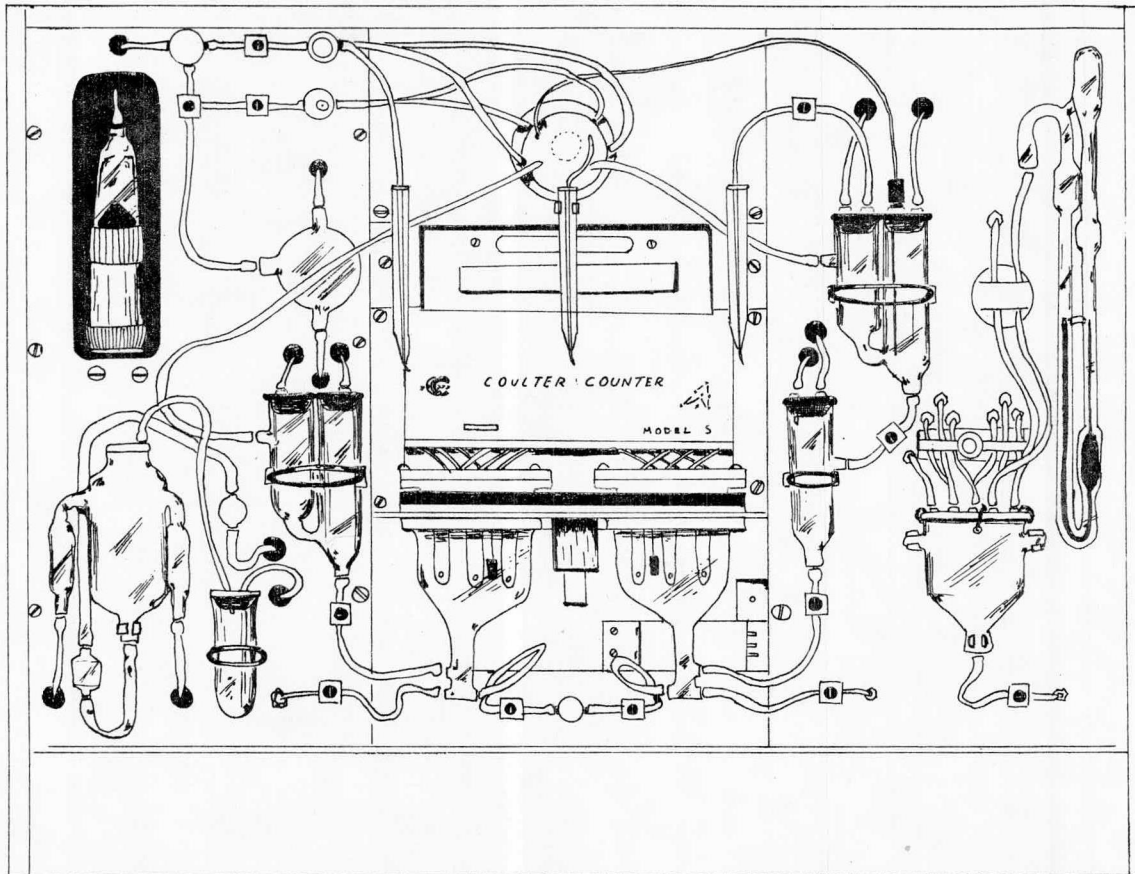
COMPUTADORA

Num 3



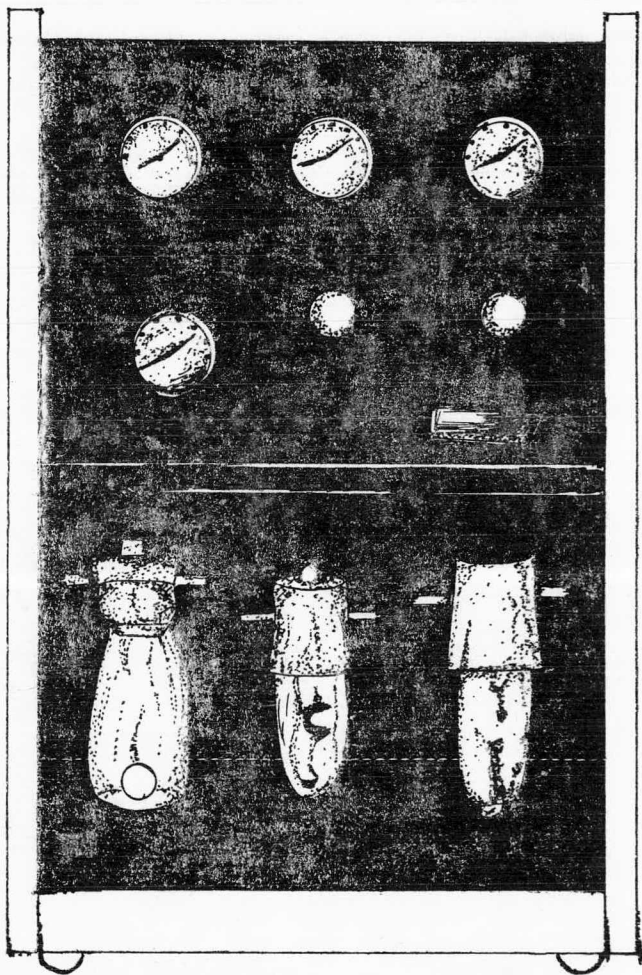
GRAFICADOR

CONTADOR COULTER
MODELO S

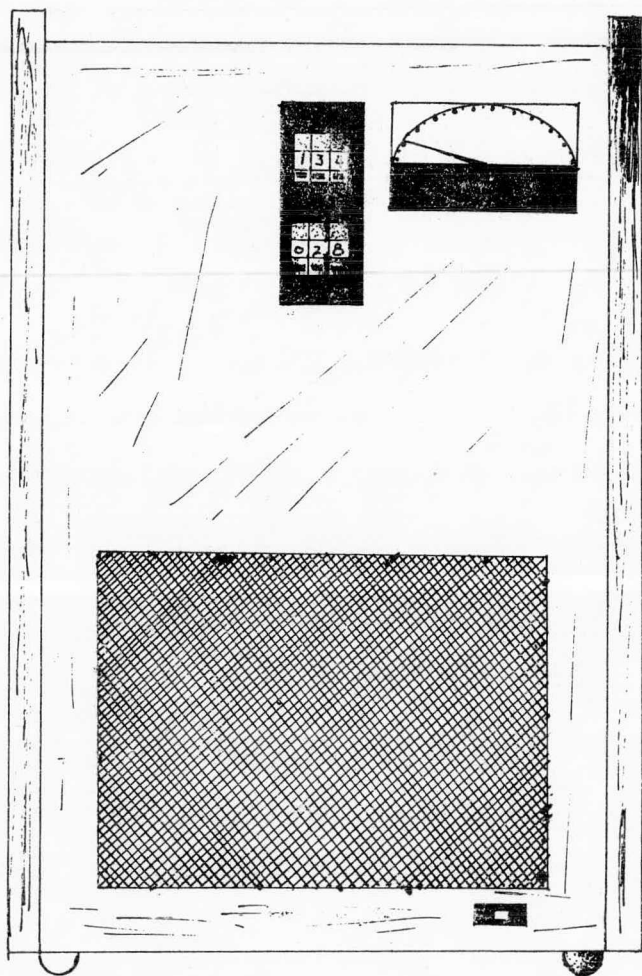


UNIDAD DILUTORA

Num. 5

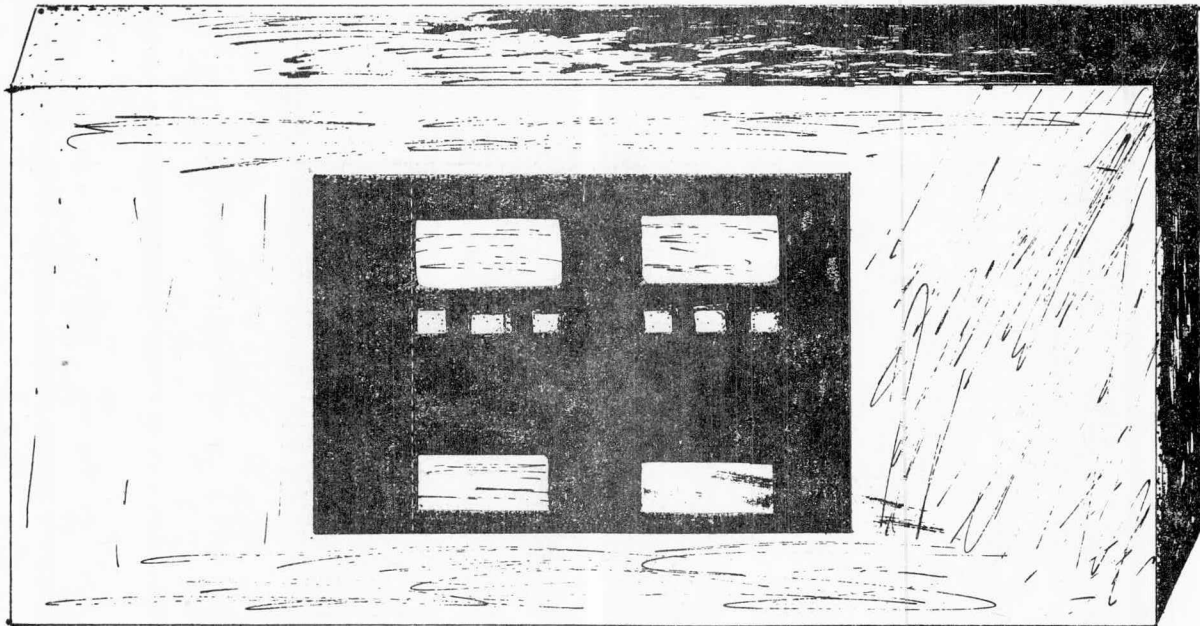


FUENTE DE ENERGIA NEUMATICA



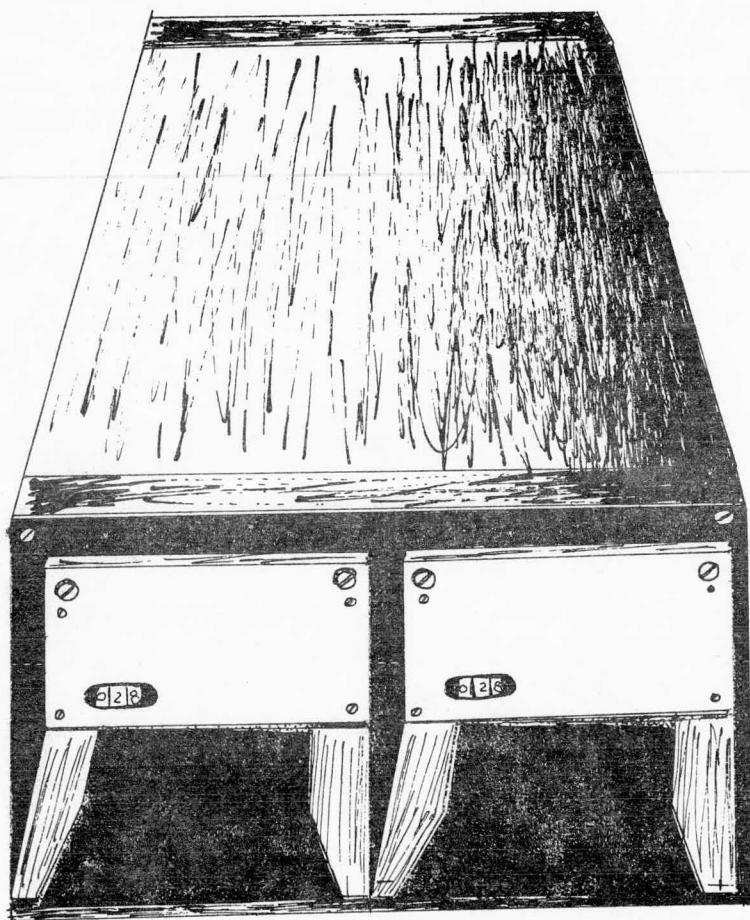
Num. 6

FUENTE DE ENERGIA ELECTRICA



Num. 7

UNIDAD COMPUTADORA



Num 8

UNIDAD IMPRESORA

VI RESULTADOS .

VALORES PARA ERITROCITOS ($\times 10^6 / \text{mm}^3$)

	Manuales VS. Technicon		Manuales VS. Coulter	
\bar{x}	4.5	4.5	4.47	4.46
x	1129.7	1126.3	1117.5	1116.2
S^2	0.49	0.47	0.62	0.635
S	0.70	0.68	0.78	0.79
$2S$	1.40	1.37	1.56	1.59
S^2	0.044	0.043	0.050	0.050
$\bar{x} 2S$	5.9	5.87	6.03	6.05
$\bar{x} S$	5.2	5.19	5.25	5.25
\bar{x}	4.5	4.5	4.47	4.46
$\bar{x} - S$	3.8	3.82	3.69	3.67
$\bar{x} - 2S$	3.1	3.13	2.91	2.91

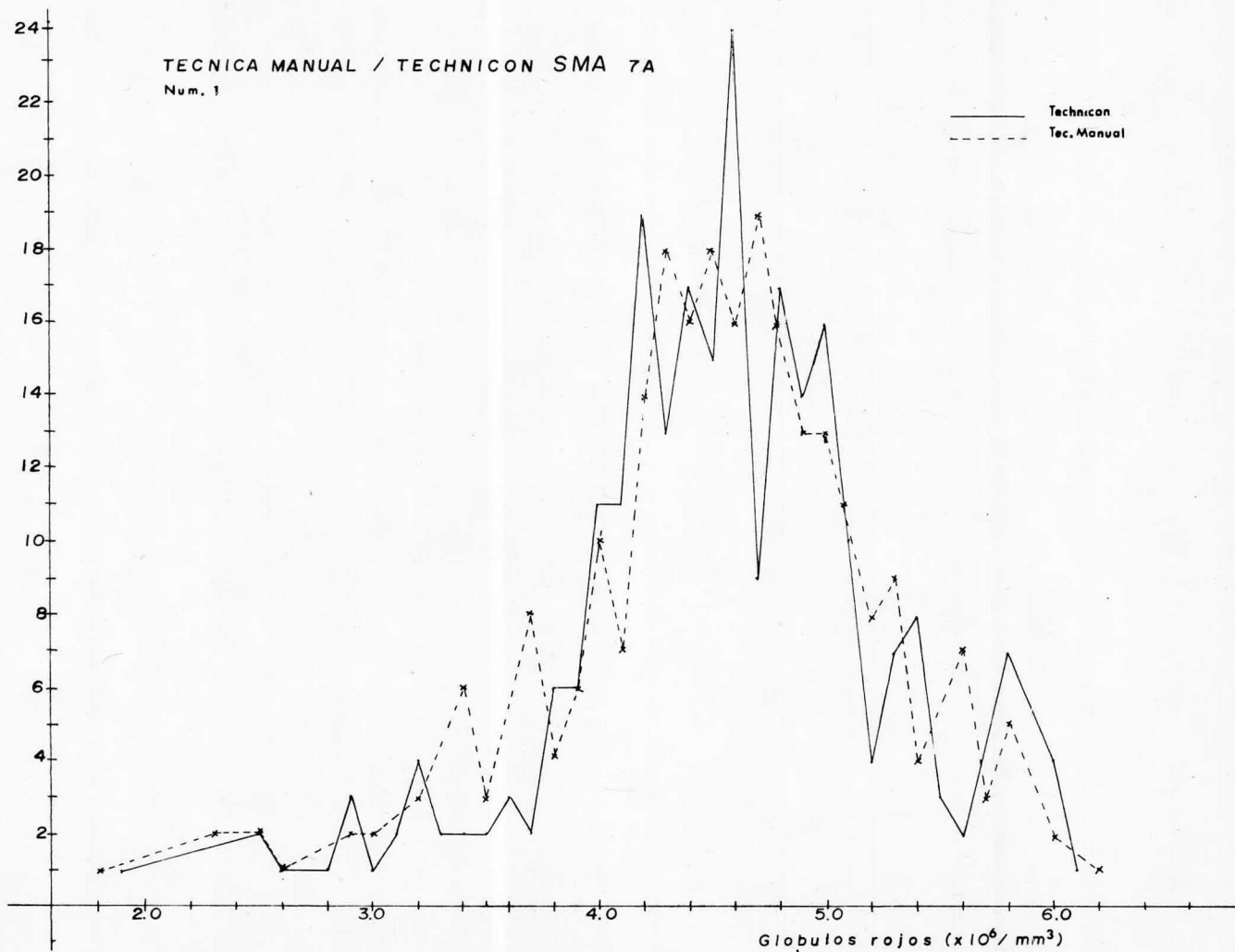
Esta tabla es correspondiente a las gráficas 1 y 2, dadas a continuación.

TECNICA MANUAL / TECHNICON SMA 7A

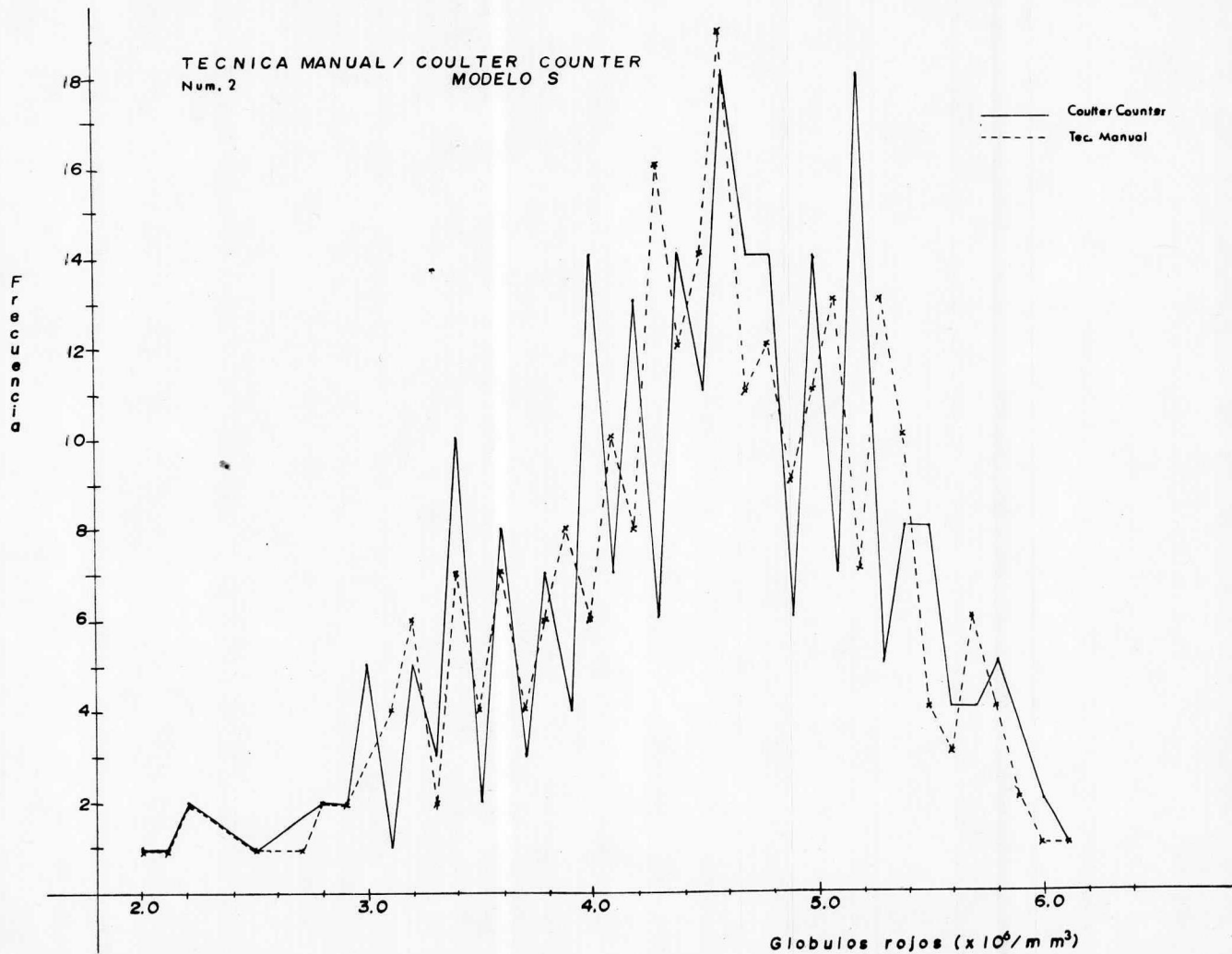
Num. 1

Frecuencia

— Technicon
- - - Tec. Manual



TECNICA MANUAL / COULTER COUNTER
Num. 2
MODELO S

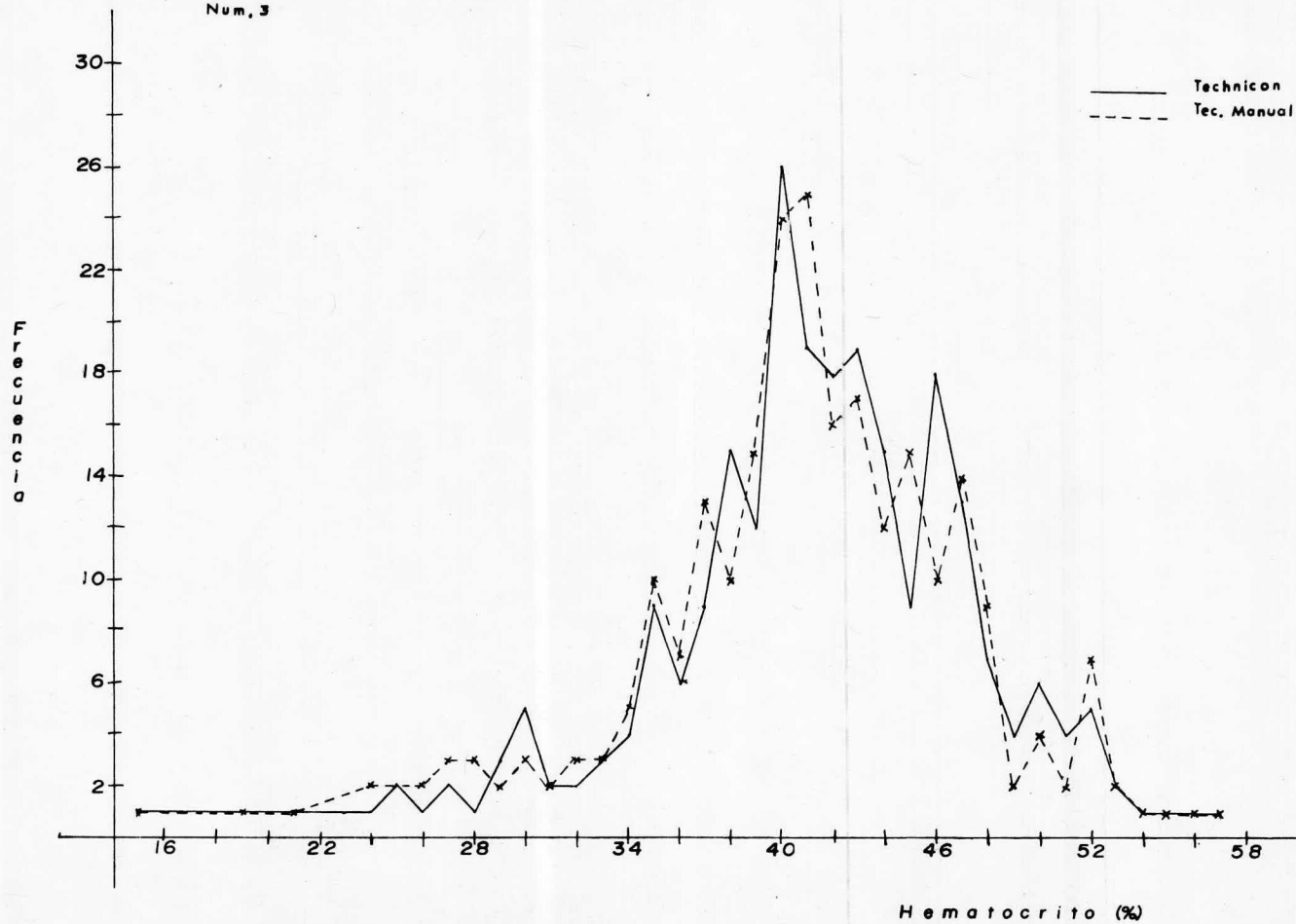


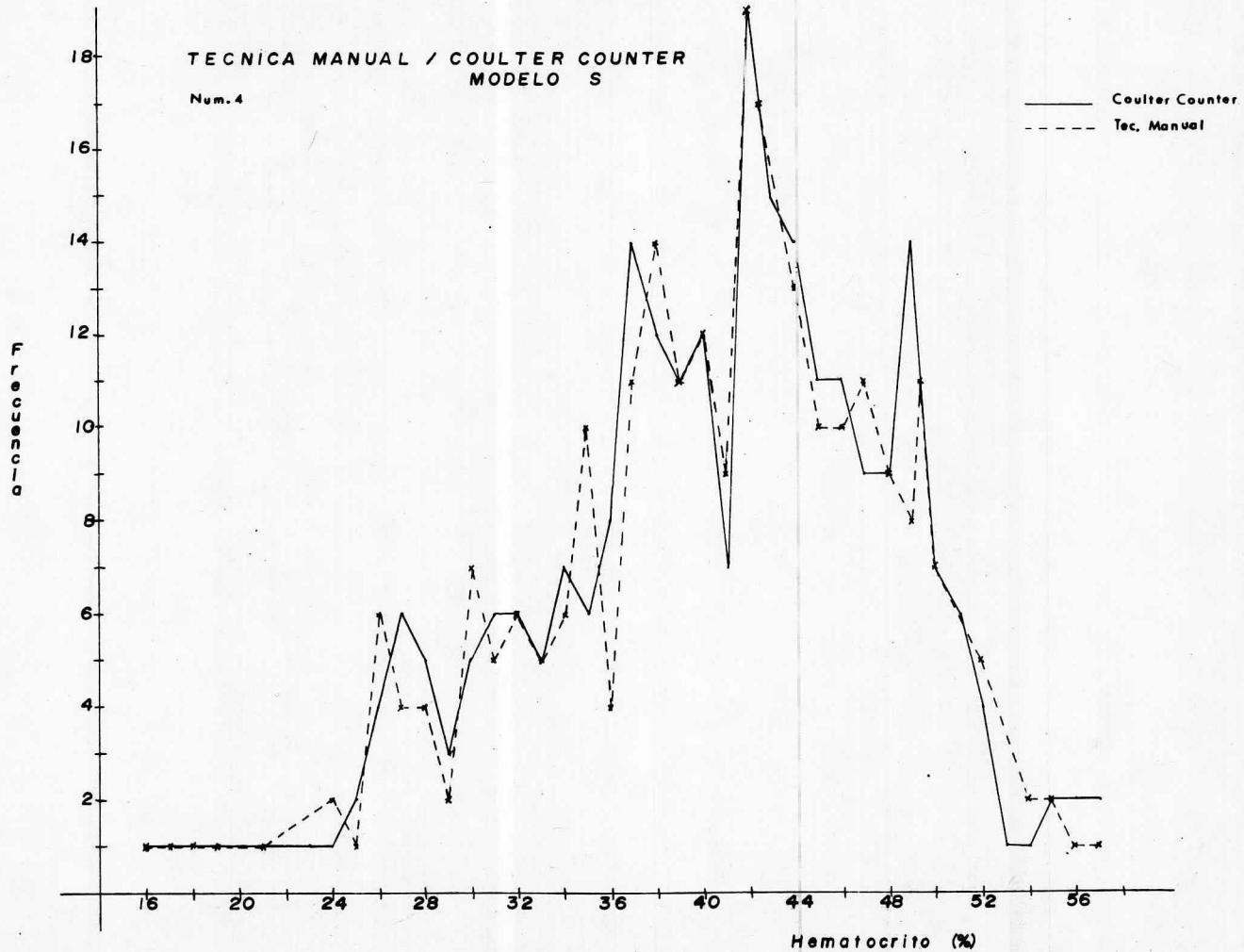
VALORES OBTENIDOS DE HEMATOCRITO (%)

	Manuales VS. Technicon.		Manuales VS. Coulter.	
\bar{x}	40.9	41.12	40.34	40.21
$\leq x$	10220	10280	10085	10053
S^2	41.75	42.55	60.64	60.06
S	6.46	6.52	7.79	7.75
2S	12.92	13.04	15.58	15.50
$S \frac{2}{x}$	0.408	0.41	0.49	0.49
$\bar{x} - 2S$	53.82	54.16	55.92	55.71
$\bar{x} - S$	47.36	47.64	48.13	47.96
\bar{x}	40.9	41.12	40.34	40.21
$\bar{x} - S$	34.44	34.60	32.55	32.46
$\bar{x} - 2S$	27.98	28.08	24.76	24.71

Tabla correspondiente a las gráficas 3 y 4.

TEC. MANUAL / TECHNICON SMA 7A
Num. 3



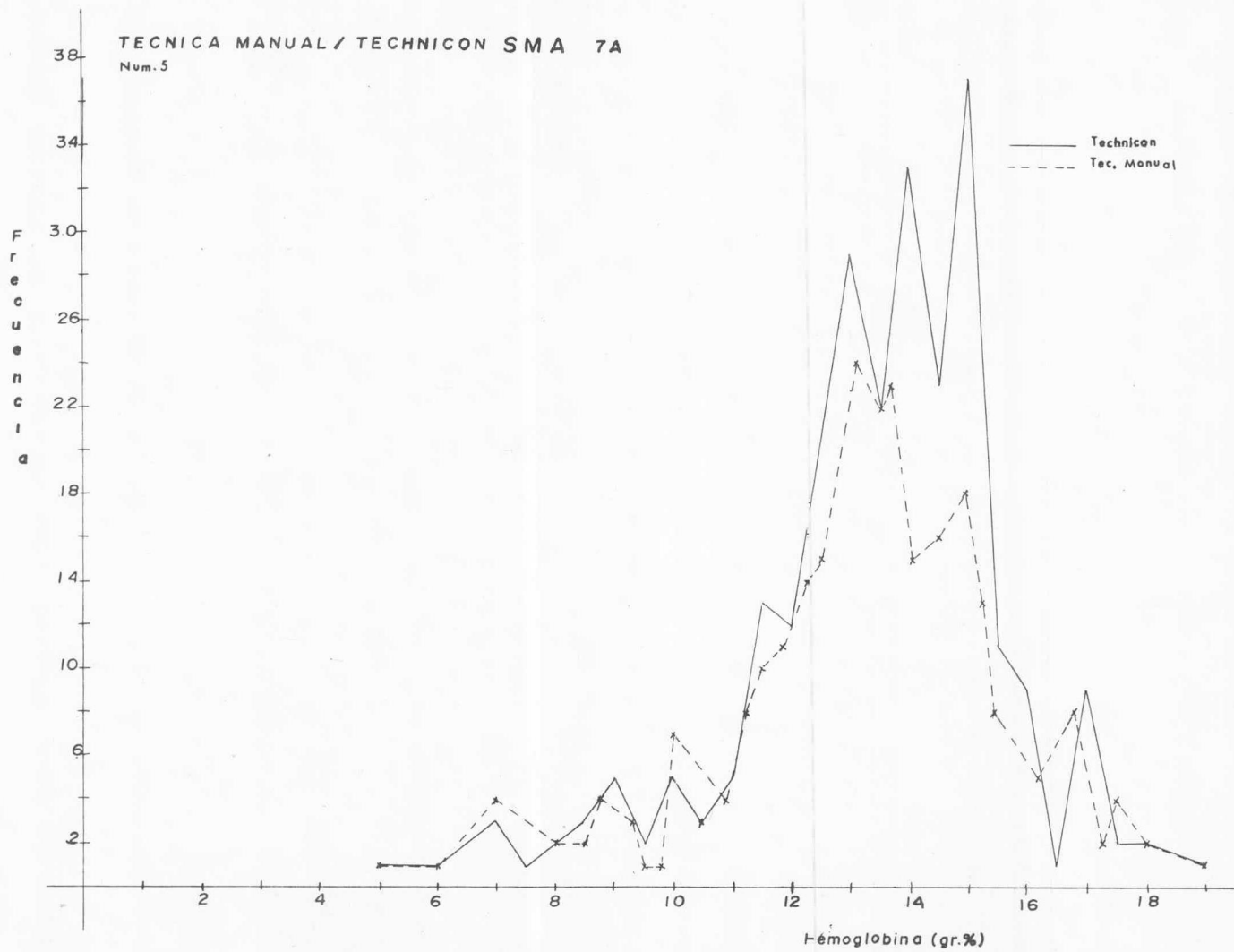


VALORES OBTENIDOS PARA HEMOGLOBINA (gr.%)

	Manuales VS. Technicon		Manuales VS. Coulter	
\bar{x}	13.2	13.48	13.15	13.17
$\leq \bar{x}$	3291.95	3371.60	3286.9	3293.3
S^2	5.08	4.64	7.31	7.01
S	2.25	2.15	2.70	2.65
2S	4.50	4.30	5.40	5.30
$S \frac{2}{x}$	0.1423	0.136	0.17	0.1676
$\bar{x}+2S$	17.7	17.78	18.55	18.47
S	15.45	15.63	15.85	15.82
\bar{x}	13.2	13.48	13.15	13.17
$\bar{x}-S$	10.95	11.33	10.45	10.52
$\bar{x}-2S$	8.7	9.18	7.75	7.87

Tabla de valores correspondiente a las gráficas 5 y 6 .

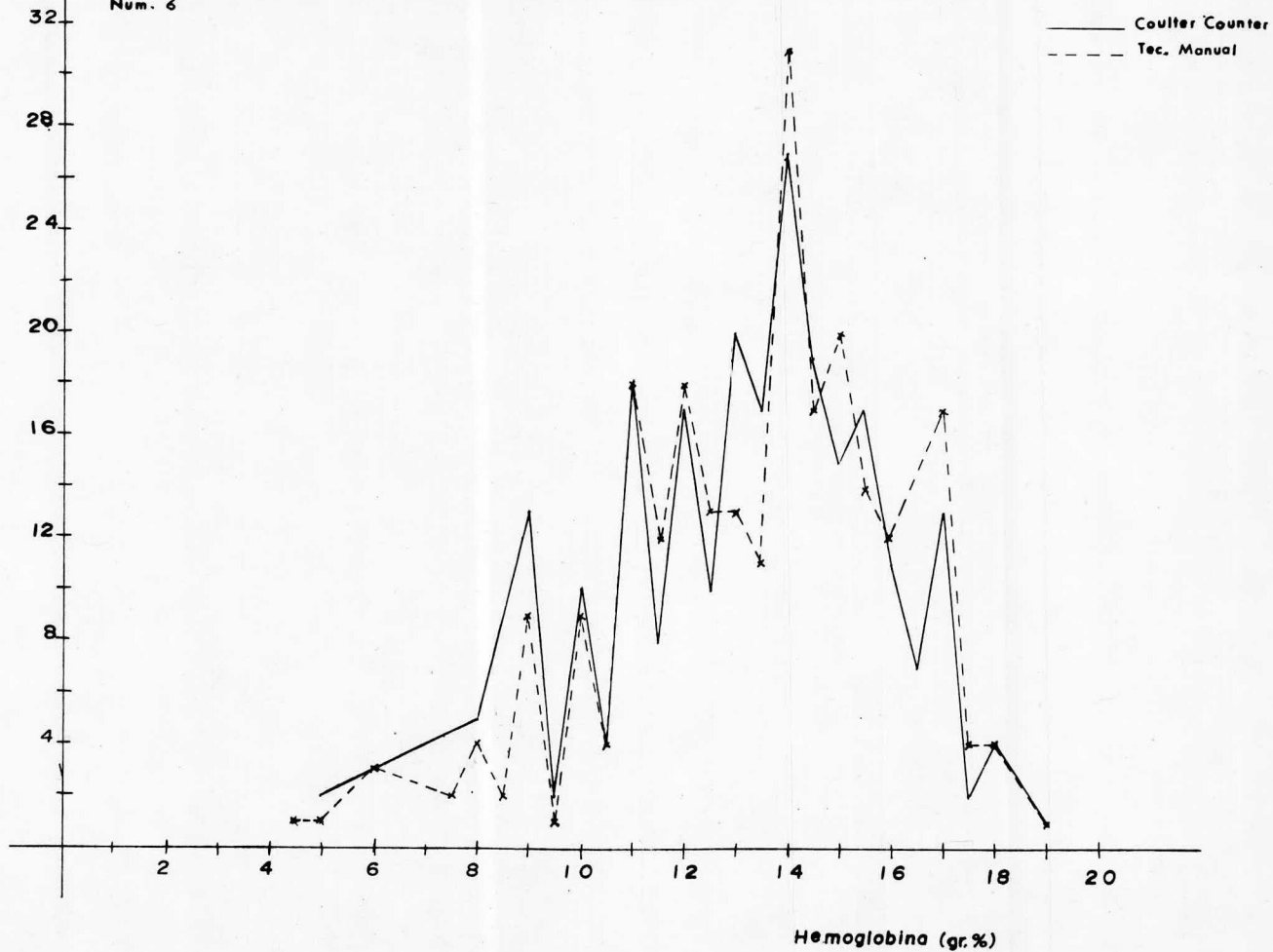
TECNICA MANUAL / TECHNICON SMA 7A
Num.5



TECNICA MANUAL / COULTER COUNTER MODELO S

Num. 6

F
r
e
c
u
e
n
c
i
a



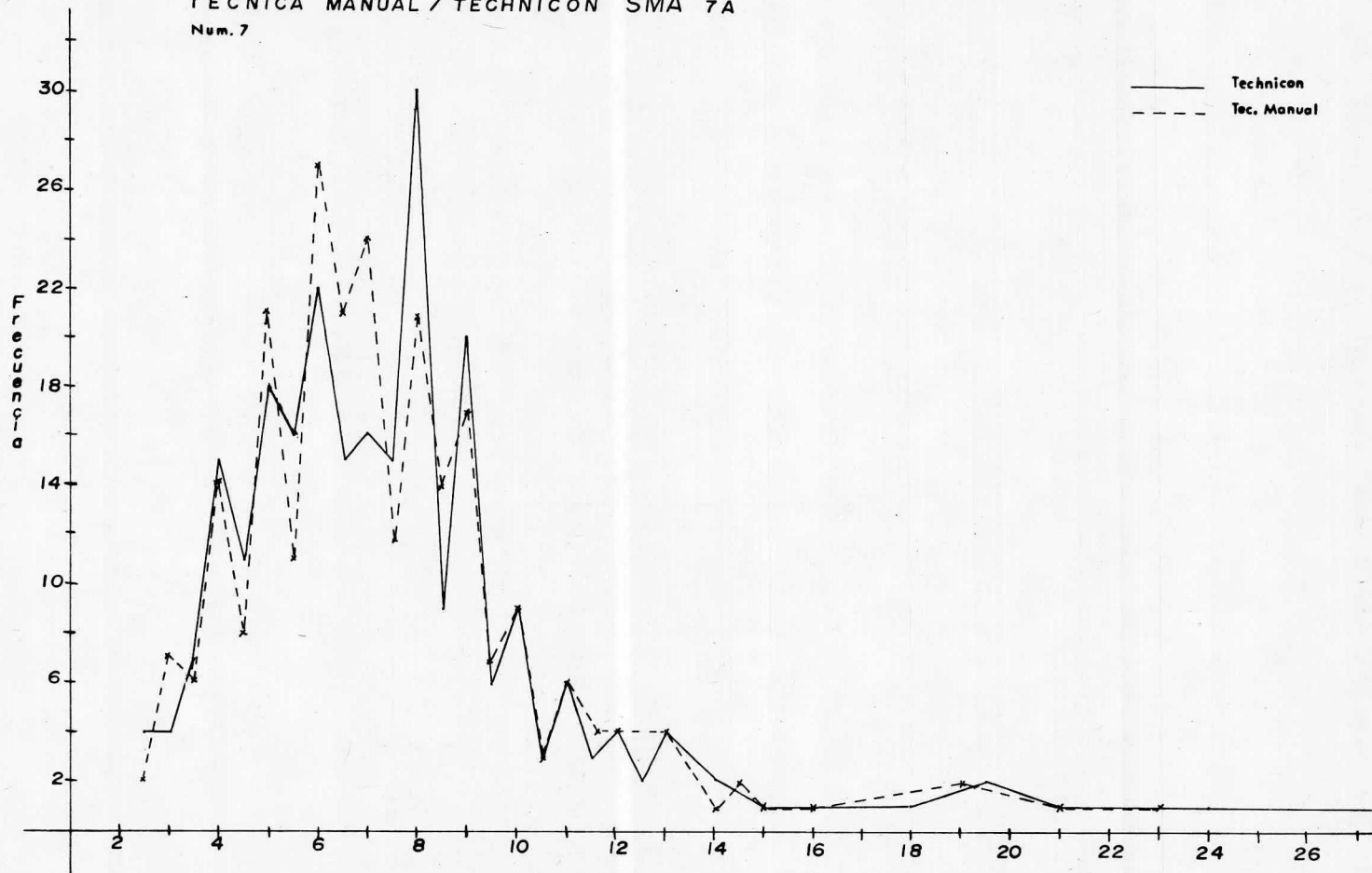
VALORES OBTENIDOS PARA LEUCOCITOS ($\times 10^3/\text{mm}^3$)

	Manuales VS. Technicon.		Manuales VS. Coulter	
\bar{x}	7.36	7.6	8.3	8.2
Σx	1840.7	1910.1	2081.3	2069.2
S^2	9.06	11.70	12.13	11.49
S	3.009	3.42	3.48	3.39
2S	6.018	6.84	6.96	6.78
$S \frac{2}{x}$	0.19	0.21	0.22	0.21
$\bar{x} - 2S$	13.38	14.44	15.26	14.98
$\bar{x} - S$	10.37	11.02	11.78	11.59
\bar{x}	7.36	7.6	8.3	8.2
$\bar{x} - S$	4.35	4.18	4.82	4.81
$\bar{x} - 2S$	1.34	0.76	1.34	1.42

Tabla que corresponde a las gráficas 7 y 8.

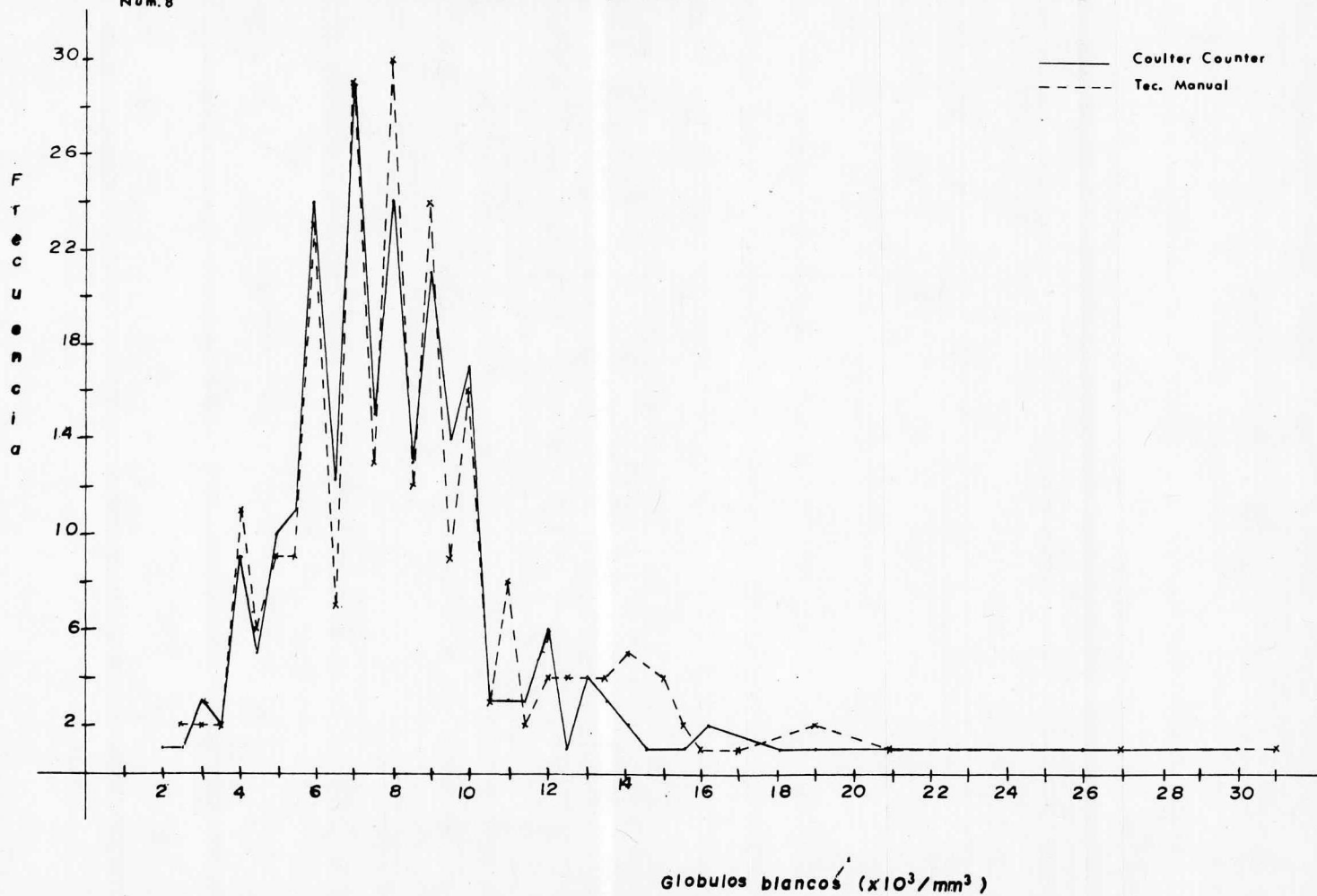
TECNICA MANUAL / TECHNICON SMA 7A

Num. 7



Globulos blancos (x 10³/mm³)

TECNICA MANUAL/COULTER COUNTER MODELO S
Num.8



VII DISCUSSION .

Los resultados obtenidos por métodos automáticos para efectuar citologías hemáticas son realmente confiables como se demuestra con las determinaciones de las desviaciones estandar calculadas para cada uno de los parámetros.

En la fórmula para desviación estandar se usó $n - 1$, debido a que el número de muestras procesadas por uno y otro método fué grande. Aproximadamente un 68 % de las lecturas están entre $\pm S$, y también aproximadamente el 95 % de éstas están entre $\pm 2S$, confirmando que los resultados son aceptables. La \bar{x} , los límites de confianza, los límites de aceptación, etc., obtenidos en cada uno de los casos (para glóbulos rojos, blancos, hematocrito y hemoglobina); son razonablemente cercanos, lo que demuestra que teniendo cuidado al trabajar las muestras, y siguiendo las indicaciones para cada aparato podemos lograr buenos resultados.

VIII CONCLUSIONES.

Se tiene la ventaja de que al trabajar con autoanalizadores, el tiempo empleado en efectuar las determinaciones es mucho menor que el usado al hacer las biometrías hemáticas por técnicas manuales, (sobre todo si se utiliza el Coulter), y que por lo tanto el volúmen de trabajo que puede realizarse eficientemente es mucho mayor.

Asimismo, se reducen los errores de reporte, porque con técnicas manuales el cansancio ocular, o una mala dilución de muestra, nos da como resultado, lecturas defectuosas, y los aparatos toman la cantidad de muestra la diluyen y efectúan todas las lecturas automáticamente.

Las causas de error más frecuentes o desventajas al utilizar estos aparatos son:

- 1.- Si no hay una buena agitación de la muestra de sangre completa y anticoagulada, puede darnos resultados que difieren del valor real para esa muestra, por ejemplo, hasta de 1 gr.% de hemoglobina; esto desde luego tratándose del Contador Coulter, ya que en el Technicon la muestra es agitada en forma automática.
- 2.- Los pacientes con valores electrolíticos altos, y los pacientes

tes a los que se ha suministrado sueros con sodio o potasio alteran el valor del hematocrito, esto puede ocurrir si trabajamos con el Technicon SMA 7A.

- 3.- También tratándose de este último autoanalizador puede haber impurezas en los reactivos o muestras, como polvo, coágulos pequeños, etc. (no detectables a simple vista), que al llegar a la celda de flujo, va a proporcionarnos datos altos para recuento de células sanguíneas.

Esto raramente ocurre en el Contador Coulter ya que posee pantallas de proyección de las aberturas que muestra cualquier obstrucción en éstas.

- 4.- Estos sistemas automáticos tienen un límite para recuento de glóbulos blancos que en el Technicon es de 25,000, y en el Coulter de $50,000/\text{mm}^3$, si tenemos muestras que excedan estas cifras, tendremos que efectuar el recuento de glóbulos blancos en un hemocitómetro.

Si se manejan los aparatos con el cuidado debido, y tomando en cuenta lo que nos puede afectar la lectura de un parámetro, los resultados son muy cercanos a los que obtenemos con técnicas manuales ya comprobadas.

Además de que el Contador Coulter Modelo S, cuenta con -
un aspirador de muestras - micro, usando solamente 44.7 λ
de sangre.

IX. BIBLIOGRAFIA .

1. - Akeroyd, J., Gibbs, M., Stefano, V. y Robinette, R.W.: On Counting leukocytes by electronic means.
Am. J. Clin. Path. **31**: 2, 1959.
2. - Allen, J.D., Algird V. y Gudaitis, M.S.: Diluting fluid for -- electronic counting of leukocytes and hemoglobin determina -- tions.
Am. J. Clin. Path. **30**: 6, 1960.
3. - Allen, J.D. y Gudaitis, A.V.: Diluting fluid for electronic -- counting of leukocytes and hemoglobin determinations.
A.M. J. Clin. Path. **36** : 220, 1961.
4. - Anderson, P.: An electronic red and white blood cell counter.
J. of Med. Tech. July, 1961.
5. - Ardsleey, C.: SMA 4A/7A. A major breakthrough in automated hematology.
Reproducido en 1966 por Technicon Instruments Corporation.
N. Y.
6. - Barnard, D.F., et. al.: An evaluation of the Coulter Model "S"
J. Clin. Pathol. **3**: 26, 1969.
7. - Beck, R.C., et. al.
Laboratory Manual of Hematologic Technic.
W.B. Saunders, Co.
Philadelphia, (1938).
8. - Berkson, J., Magath, T.B. y Burn, M.: The error of estimate of the blood cell coun as made with the Hemocytometer.
A. Jour. Physiol. **128**: 309, 1940.
9. - Briggs, R. y Mac. Millan, R.L.: The errors of some hemato -- logical methods as they are used in the routine laboratory.
J. Clin. Path. **1**: 269, 1948.
10. - Blades, A.N. y Flavell, C.G.: Absolute red cell values and -- indices.
J. Med. Lab. Tech. **21**: 3, 1964.
11. - Blum, L.L. etc. al: The photoelectric erythrocyte count - - - basic principles and technique.
Am. J. Clin. Path. **15**: 85, 1945.

- 12.- Blum, L.L.: The photoelectric determination of erythrocyte count.
Am. Jour. Clin. Path. **16**: 53, 1956.
- 13.- Brackett, F.S., Mattern, C.F. y Olson, B.J.: Instrument - for counting erythrocytes by Scatter Photometry.
A.M. J. Clin Path. **23**: 731, 1956.
- 14.- Brecher, G., Schneiderman, M. y Williams, G.Z.: Evaluation of electronic red blood cell counter.
Am. J. Clin. Path. **26**: 1439, 1956.
- 15.- Brecher, G. Jakobek, E. y Schneiderman, M.: Size distribution of erythrocytes.
Annals of the N.Y. Academy of Sciences. **99**: 242, 1962.
- 16.- Carl, F. y Mattern, F.: Determination of number and size of particles by electrical gating: Blood Cells.
J. Appl. Physiol, **10**: 56, 1957.
- 17.- Ch'U, Y., y Forkner, C.E.: Errors in erythrocyte counts due to Hayem's Solution avoided with Gower's Solution.
Jour. Lab. Clin. Med. **23**: 1282, 1938.
- 18.- Cohen and Smith:
J. Biol. Chem. **39**: 499, 1919.
Citado en Diagnos. Clínicos de Laboratorio. Levinson, 1964.
- 19.- Coulter, W.H.: High speed automatic blood counter and -- cell size analyzer. Coulter Electronics, Hlh., Fla.
Presentado antes de la conferencia nacional de electrónica. Chicago, Ill. octubre 3, 1956.
- 20.- Crosby, W.H., Munn, J.I. y Furth, F.W.: Standarizing a method for clinical hemoglobinometry.
U.S. Armed Forces Med. J. **5**: 693, 1954.
- 21.- Crosland, T., Stewart, P. J. y Haggist, G.: An electronic blood cell counting machine.
Blood. **13**: 398, 1958.
- 22.- Dalnd, J.: Ueber das volumender rother und weissen - - - blutkorperchen in glute des gesunden and kraken menschen.
Fortschr. D. Med. **9**:867, 1891.

- 23.- D'Angelo, G. y La Combe, M.: A practical diluent for electronic white cell counts.
Am. J. Clin. Path. **38**: 658, 1962.
- 24.- D'Angelo, G.: Electronic blood cell counter.
Canad. J. Med. Tech. **26**: 120, 1964.
- 25.- Davis, R.L. y Nicol, D.J.: A new system for haemoglobin - estimations and leukocyte counts.
J. Clinical Path. **17**: July, 1964.
- 26.- Dorsey, D.B.: Manual for workshop on quality control in Hematology.
Am. Soc. Clin. Path. Chicago, 1954.
- 27.- Drabkin, D.: The standarization of hemoglobin measurement.
Am. Jour. Med. Sci. **217**: 710, 1949.
- 28.- Dutcher, M.D. y Thomas, F.: Erythrocyte Indices and corpuscular constants revisited.
Lab. Med. Febr., 1971.
- 29.- Dutra, F.R.: Monitoring the quality of blood cell counts with replicate determinations on routine samples.
Am. J. Clin. Path. **46**: 286. 1966.
- 30.- Eastham, R.D.: A simple method for separating platelets -- from red cells before enumeration with an electronic counter.
J. Clin. Path. **18**: 248, 1965.
- 31.- Evelyn, K.A. y Malloy, H. T.: Microdetermanation of - - - Oxyhemoglobin, Methemoglobin and Sulfhemoglobin in a - - single sample of blood.
J. Biol. Chem **126**: 655, 1938.
- 32.- Feichtmeir, T., Nigon, K., Hannan, M.A., Bird, D.B. y Carr, L.: Electronic counting of erythrocytes and the leukocytes.
Tech. Bull. Registry M. Technologists. **31**: 39, 1961.
- 33.- Gagon, T., Athens, J., Boggs, D. y Cartwright, G.: An - evaluation of the variance of leukocyte counts as performed with the hemocytometer, Coulter, and Fisher Instruments.
Am. J. Clin. Path. **46**: 684, 1966.

- 34.- Geoffrey, M. Brittin, A., Brecher, G., Johnson, C. y Elashoff, R.: Stability as blood in commonly used anticoagulants. *Am. J. Clin. Path.*, **52**: 6, 1969.
- 35.- Gradwohl.
Clinical Laboratory Methods and Diagnosis.
6a. Ed.
N.Y., 1963.
- 36.- Graham and Norgard: Indices erythrocyt. (V.I.)
Arch. Int. Med. **31**: 164, 1923.
- 37.- Grant, J., Britton, M. y Kurtz, T.: Measurement of red blood cell volume with the electronic cell counter.
Am. J. Clin. Path. **32**: 2, 1960
- 38.- Haden, R.L.: Accurate criteria for different anemias.
Arch. Int. Med. **31**: 766, 1923.
- 39.- Haden, R.L.: The volume thickness index of the erythrocyte - of man.
Jour. Lab. Clin. Med. **20**: 567, 1935.
- 40.- Hadley, G. y Weiss, S.: Further notes on use salts of EDTA as anticoagulants.
Am. J. Clin. Path. **25**: 1090, 1955.
- 41.- Hatch, A. y Balazs, T.: The use Cetavlon in a diluent for - - counting leukocytes in the Coulter Electronic Counter.
J. Clin. Path. **36**: 220, 1961.
- 42.- Hattersley, M. y Ragusa, D.: An electronic mean cell volume computer and hematocrit accessory.
Technical Bull of Registry of Medical Technologist. **37**: 1, 1967
- 43.- Heller, V. y Paul, H.: Changes in cell volume produced by varying concentration of different anticoagulants.
J. Lab. Clin. Med. **19**: 777, 1934.
- 44.- Helman, L., et. al.
Medical Technology Board Examination Review.
7a. Ed.
Berckley, Scientific Publ.
N. Y., 1972.

- 45.- Hicks, R., Schenken, J. and Steinrauf, M.A.
Laboratory Instrumentation.
Harper and Row, Publ. Inc.
N.Y., 1974.
- 46.- Johnson, J. et. al: Mitohematocrit versus erythrocyte count.
A. J. M. T. **23**: 199, 1957.
- 47.- Kerner, J., Wurzel, H. y Okada, R.: New electronic method
for measuring hematocrit: A clinical evaluation.
Jor. Lab. Clin. Med. April, 1961.
- 48.- Lampasso, J.A.: Error in hematocrit value produced by - -
excessive EDTA.
Am. J. Clin. Path. **44**: 109, 1965.
- 49.- Lampasso, J.A.: Changes in hematologie values induced by-
storage of EDTA human blood for varing periods of time.
AM. J. Clin. Path. **49**: 443, 1968.
- 50.- Lancastre, F., Gineste, J. y Maupin, B.: Numeration des -
hematies, des leukocytes et des plaquettes du sang au moyen
d'un comteur electronique de particules.
Nouvelle Revue Francaise d'Hematologie. **5**: 3, 1965
- 51.- Levinson, S. y Mac. Fate, R.
Diagnóstico Clínico de Laboratorio.
2a. Ed.
"El Ateneo", S.A.
Barcelona, 1964.
- 52.- Lewis, G. K., Ohlson, M.A., Caderquist, D.A., Donelson,
E.: The corpuscular constants of college women of the Nort
Central St.
J. Lab. & Clin. Med. **32**: 419, 1947.
- 53.- Mac. Farlane, R. y col.: An automatic apparatus for coun--
ting red blood cells.
Brit. J. Haemat, 581, 1959.
- 54.- Magath, T., Berkson, J., Hurn, M.: The error of determina
tion of the erythrocyte count.
Am. J. Clin. Path. **6**: 568, 1936.
- 55.- Magath, T. y Berkson, J.: Electronic blood cell counting.
Am. J. Clin. Path. **34**: 203, 1960.

- 56.- Manual de Instrucción del Contador Culter Modelo S.
Coulter Electronics, Inc.
Hialiah, Fla. U. S. A., Dic., 1973.
- 57.- Manual de Instrucción de Technicon SMA 7A.
Tech. Cor. Tarrytown, N. Y., 1969.
- 58.- Marsh, H. H.: A modification of the Klett - Summerson --
colorimeter.
Am. J. Clin. Path. **37**: 115, 1962.
- 59.- Miale, J.B.
Laboratory Medicine Hematology.
C.V. Mosby, Co., 1958.
- 60.- Otis, R. y Tennant, R.: Hydrochloric acid for stromatolysis
of erythrocytes in Coulter Leukocyte counting.
Am. J. Clin. Path. **35**: 4, 1961.
- 61.- Okada, R. y Hand Schwan, H.: An Electrical method to - - -
determine hematocrits, transactions on medicals.
Electronics. July. 1960.
- 62.- Pegg, D. E. y Antcliff, A.: Evaluation of the vickers instru-
ments. J. 12 cell counter.
J. Clin Path. **18**: 472, 1965.
- 63.- Peters y Van Slyke.: Oxihemaglobin Technic.
Quantitative. Clin. Chem. **1**: 52, 1932.
- 64.- Pijper, A.: The diffraction method of meassuring red blood
cells.
J. Lab. Clin. Med. **32**: 857, 1947.
- 65.- Plum, P.: Accuracy of Haematological counting method.
Acta. Med. Scandinav. **90**: 342, 1936.
- 66.- Price - Jones.
Red cell blood diameters.
Oxford University Press.
London, 1934.
- 67.- Price - Jones: Proposal for adoption of and internstional - -
method and standard solution for hemoglobinometrio.
Bllood. **26**: 704, 1965.
- 68.- Pruden, E. y Winstead, M.: Accuracy control of blood cell
counts with the Coulter Counter. Lutheran Hospital, for --
Wayne, Ind. & Soud Bend Medical Found., Soud Bend Indiana.

- 69.- Richar, W. A. y Breakell, E.: Evaluation of electronic -- particle counter for the counting of white blood cells.
Am. J. Clin. Path. **31**: 381, 1959.
- 70.- Scheidt, R. y Blake, W.: Use of a suspension of latex particles of known concentration for monitoring the Coulter - Counter.
- 71.- Sheard, C., y Standford, A.H.
J. Clin. Path. **14**: 558, 1929.
Citado en la Hematología Clínica de Wintrobe, 1961.
- 72.- Sheard, C., Standford, A.H.
J. Clin. Path. **3**: 412, 1944.
- 72.B Sheena, A.H., Fox, F.F., Baybra, M. y Stevens, K.M.:
A simple microtechnic for screening abnormal hemoglobins and quantiation of A₂ hemoglobin by electrophoresis on cellulose acetate.
Am. J. Clin. Path. **50**: 142, 1968.
- 73.- Strumina, M., Sample, A. y Hart, E.: An improved micro-hematocrit method.
Am. J. Clin. Path. **24**: 1016, 1954.
- 74.- Sunderman, F. et. al: Symposium on clinical hemoglobino-metry.
Am. J. Clin. Path. **23**: 519, 1953.
- 75.- Tompkins, E.: Methods to increase accurancy in the use of Hayem's Solution of red blood counts.
J. Lab. Clin. Med. **33**: 1180, 1948.
- 76.- Turpin, M.T.: A comparison of erythrocyte count by various methods.
The Am. Med. Tech. Jan. 1963.
- 77.- Weed, R. and Bowdler, A.: The influence of hemoglobin con-centration on the distribution pattern the volumes of human erythrocytes.
U. Rcohester, Sch. Med. & Dentistry, Rochester, N.Y.
- 78.- Willoughby, D.: Laboratory suggestion, one pipetting for - white blood cells and hemoglobin, for use with a Coulter - Counter.
The Am. J. Clin. Path. **35**: 1, 1961.

- 79.- Wintrobe, M.M.: A simple and accurate hematocrit.
J. Lab. & Clin. Med. **15**: 287, 1929.
- 80.- Wintrobe, M.M.: The volume and hemoglobin content of the red blood corpuscle.
Am. J. Med. Science, **177**: 513, 1929.
- 81.- Wintrobe, M.M.: The erythrocyte in man.
Medicine. **9**: 195, 1930.
- 82.- Wintrobe, M.M.: The direct calculation of the volume and hemoglobin contents of the erythrocyte.
Am. J. Clin. Path. **1**: 147, 1931.
- 83.- Wintrobe, M. M.: The size and hemoglobin contents of the erythrocyte.
J. Lab & Clin. Med. **17**: 899, 1932.
- 84.- Wintrobe, M.M.
Am. J. Med. Sci. **185**: 58, 1933.
- 85.- Wintrobe, M.M.: Anemia: Clasification and treatment of the basic of diferences in the average volume and hemoglobine content of the red corpuscle.
Arch. Int. Med. **54**: 256, 1934.
- 86.- Wintrobe and Lansberg.
Am. J. Med. Sci. **189**: 102, 1935.
- 87.- Wintrobe, M.M.
Clinical Hematology
5a. Ed.
Henry Kempton
London, 1961.
- 88.- Wong.
J. Biol. Chem. **55**: 421, 1923.
- 89.- Wu, H.: Studies on Hemoglobin
Jour. Biochem. **2**: 173 y 189, 1922.

Esta Tesis se Imprimió en Agosto de 1978
empleando el sistema de reproducción Foto-Offset,
en los Talleres de Impresos Offsali-G, S. A. Av.
Colonia del Valle No. 535 (Esq. Adolfo Prieto),
Tels. 523-03-33 y 523-21-05 México 12, D. F