

Valor práctico comparado de los métodos Thoma-Zeiss y Bürker en hematología

Por E. CÁNEPA

Al desarrollar el tema que encabeza este modesto trabajo, que el jurado de profesores, presidido por el señor decano y formado por los distinguidos maestros doctores César Zanolli, Francisco Rossembuch y Carlos Lerena ha tenido a bien indicarme como tesis de profesorado, he procurado hacerlo en la forma más clara y concisa que me ha sido posible, tratando de llegar al mismo tiempo a conclusiones, que puedan aprovecharse en el recuento de los glóbulos de la sangre de nuestros animales domésticos.

La descripción de las instrucciones para la numeración de los hematíes primero, y de los leucocitos después, tanto para el método de Bürker como para el de Thoma-Zeiss, constituye la primer parte del trabajo. En ellas me he ajustado a las prescripciones indicadas por los respectivos autores por la casa Carl Zeiss, de Jena, que fabrica ambos aparatos (1).

Las instrucciones que se refieren al método de Bürker han tenido necesariamente que ser más detalladas, por tratarse de un procedimiento ideado muy posteriormente al de Thoma y por ende, mucho menos conocido y además, porque el autor describe el aparato y la manera de usarlo, con notable minuciosidad.

Debo dejar constancia aquí, de mi agradecimiento al doctor Cesar Zanolli, que me ha prestado su valiosa ayuda, en la traducción de la versión alemana, de dichas instrucciones.

(1) El aparato cuenta glóbulos de Thoma, lo fabrican, en la actualidad, otras casas que se dedican al mismo ramo.

El segundo capítulo lo dedico al estudio comparativo del valor práctico de ambos sistemas, en la numeración de los hematíes y de los leucocitos.

La tercera y última parte comprende, las consideraciones que surgen de los capítulos anteriores, las investigaciones personales y las conclusiones que puedan ser de provecho para la numeración de los elementos figurados de la sangre, con relación a la semiología veterinaria.

CAPÍTULO I

INSTRUCCIONES PARA LA NUMERACIÓN DE LOS HEMATÍES SEGÚN BÜRKER

I. *Características del método.* — La cámara de numeración de Bürker, antes de llenarla, queda armada con ayuda de las grampas que aprietan el cubre-objetos.

El espacio de numeración, que permanece independiente de la presión atmosférica, está dividido en dos secciones, en el piso de cada una de las cuales, se encuentra tallada una red de numeración de $9,3 \text{ mm.}^2$ de superficie. La medida de la sangre y la del líquido de dilución se efectúa con pipetas independientes; la mezcla de ambos se practica en baloncitos especiales donde, los hematíes, pueden quedar durante varios días, aptos para la numeración.

Para la transvasación de la mezcla, en las dos secciones del espacio de numeración, se utilizan dos pipetas provistas de una ampolla de caucho. La mezcla penetra rápidamente, por capilaridad, en la cámara de numeración. Siempre se cuenta en las dos secciones. El resultado numérico obtenido, se registra en esquemas impresos que contienen solamente y en forma aumentada, la parte de la red en la que se cuentan los hematíes.

II. *Aparato.* — El aspecto de todas las partes del aparato, en su estuche, lo da la fotografía figura 1.

En la mitad de un grueso porta-objetos se halla pegado un trozo de vidrio alargado y a extremidades redondeadas, cuya cara superior representa la superficie de numeración. Esta se encuentra dividida en dos secciones por un surco de 2 milímetros de ancho; cada sección tiene una red de numeración de $9,3 \text{ mm.}^2$.

La red de numeración está formada por: *a)* pequeños cuadrados grandes de $1/20 \text{ m.}$ de lado, *b)* rectángulos de $1/20 \times 1/20 \text{ m.}$ y *c)* cuadrados de $1/20 \text{ m.}$ por cada lado.

Los hematíes se cuentan únicamente en los pequeños cuadrados de $1/400$

de mm^2 de superficie (en la fig. 2 por el aumento de 20 veces del natural tienen exactamente 1 mm^2 .) los cuales están separados unos de otros por los rectángulos. Con objeto de facilitar la orientación, algunos de estos pequeños cuadrados están provistos de señas talladas que forman cruces, estrías transversales y estrías longitudinales.

A ambos lados del trocito de vidrio que lleva la superficie de nume-

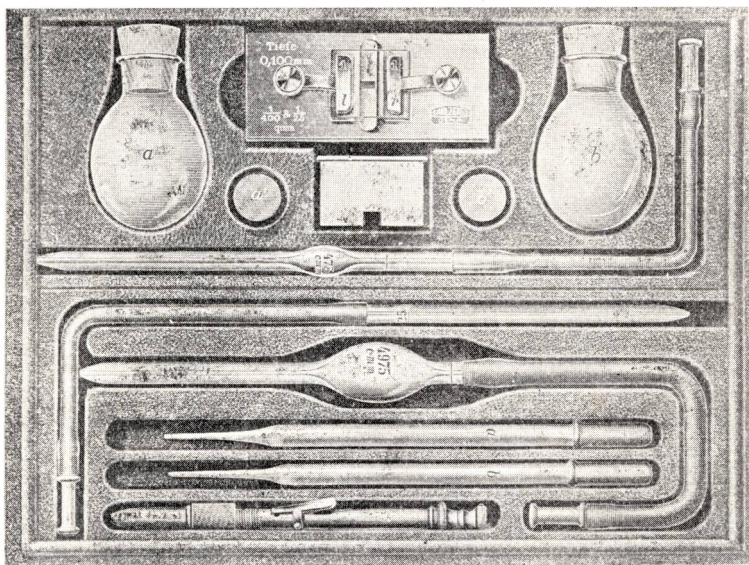


Fig. 1. — Aparato de Bürker para la numeración de los glóbulos rojos y blancos de la sangre. (1/1,73 del tamaño natural).

El estuche contiene :

Una cámara de numeración con grampas elásticas.

Una pipeta para sangre de 25 mm^3 .

Dos pipetas de transvasación.

Dos baloncitos para mezcla, con tapón de goma para recuento de hematies.

Una pipeta de dilución de 4975 mm^3 para recuento de hematies.

Dos baloncitos pequeños para mezcla, con tapón de goma, para recuento de leucocitos.

Una pipeta de dilución de 475 m^3 . Para recuento de leucocitos.

Un cubre-objetos levantado.

Un instrumento de Francke Bürker para la extracción de la sangre.

Una cámara húmeda.

ración y a una distancia de $1,5 \text{ mm}$. están pegados dos pedacitos de vidrio más anchos, más cortos y $0,1 \text{ mm}$. más gruesos que aquél.

Si se coloca, sobre dichos pedacitos de vidrio, como si fueran un soporte, un cubre-objetos (de $0,04 \text{ mm}$. de espesor) rectangular, con bordes redondeados y pulidos, en tal forma que sobre todo el soporte, se

de mm^2 de superficie (en la fig. 2 por el aumento de 20 veces del natural tienen exactamente 1 mm^2 .) los cuales están separados unos de otros por los rectángulos. Con objeto de facilitar la orientación, algunos de estos pequeños cuadrados están provistos de señas talladas que forman cruces, estrias transversales y estrias longitudinales.

A ambos lados del trocito de vidrio que lleva la superficie de nume-

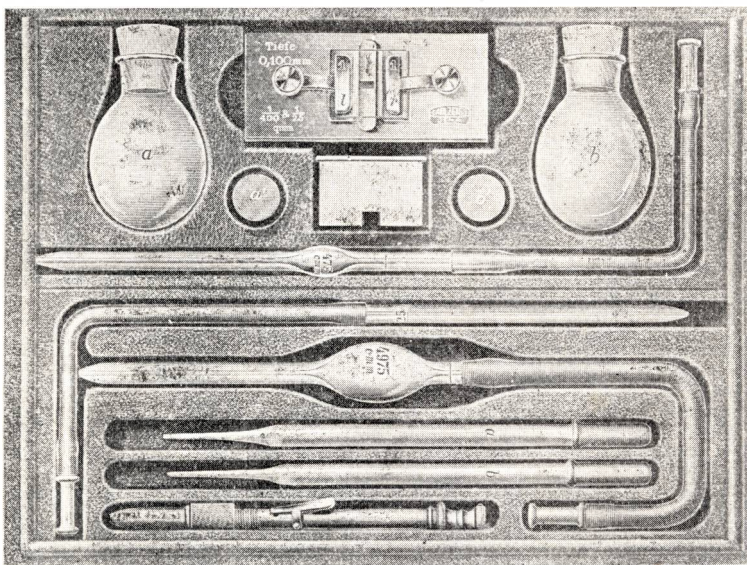


Fig. 1. — Aparato de Bürker para la numeración de los glóbulos rojos y blancos de la sangre. (1/1,73 del tamaño natural).

El estuche contiene:

Una cámara de numeración con grampas elásticas.

Una pipeta para sangre de 25 mm^3 .

Dos pipetas de transvasación.

Dos baloncitos para mezcla, con tapón de goma para recuento de hematies.

Una pipeta de dilución de 4975 mm^3 para recuento de hematies.

Dos baloncitos pequeños para mezcla, con tapón de goma, para recuento de leucocitos.

Una pipeta de dilución de 475 m^3 . Para recuento de leucocitos.

Un cubre-objetos levantado.

Un instrumento de Francke Bürker para la extracción de la sangre.

Una cámara húmeda.

ración y a una distancia de $1,5 \text{ mm}$. están pegados dos pedacitos de vidrio más anchos, más cortos y $0,1 \text{ mm}$. más gruesos que aquél.

Si se coloca, sobre dichos pedacitos de vidrio, como si fueran un soporte, un cubre-objetos (de $0,04 \text{ mm}$. de espesor) rectangular, con bordes redondeados y pulidos, en tal forma que sobre todo el soporte, se

	Gramos
Sulfato de soda.....	5
Cloruro de sodio.....	1
Bicloruro de mercurio.....	0.5
Agua destilada.....	200

Esta solución se conserva bien largo tiempo. Un pequeño depósito que se forme con el tiempo, no perjudica, pues no debe sacudirse la solución. Si la solución de Hayem produce aglutinación de los hematíes, lo que puede ocurrir en la sangre patológica del hombre y aún en la normal de varias especies animales, se utiliza, como líquido de dilución, la solución de Ringer o, mejor, la de Tyrode.

Solución de Ringer

	Gramos
Cloruro de sodio.....	0,6
— cal.....	0,02
— potasio.....	0,01
Agua destilada.....	100,00

Solución de Tyrode

	Gramos
Cloruro de sodio.....	0,8
— cal.....	0,02
— potasio.....	0,02
— magnesio.....	0,01
Monofosfato de sodio.....	0,005
Bicarbonato de sodio.....	0,1
Glucosa.....	0,1
Agua destilada h. c. (c. c.).	100,00

La pipeta para la medida de 25 mm³ de sangre, tiene igualmente punta cónica y pulida, una marca circular y lleva también tubo de goma y pieza bucal de vidrio. La parte del capilar de medición es más o menos de 90 mm. de largo. El espacio interior, arriba de la marca circular, es de mayor tamaño, para facilitar la limpieza.

El baloncito para la mezcla del líquido de dilución y de la sangre tiene una parte esferoidal y una cilíndrica; en la primera se lleva el líquido y la sangre y se efectúa allí la mezcla de los dos. Para taparlo se emplea el tapón de goma. El aparato trae dos de estos baloncitos. Para colocarlos verticalmente se provee de un pedazo de madera con su escavación correspondiente o se utiliza un recipiente apropiado, de vidrio.

Las dos pipetas de transvasación son más o menos de 15 centímetros de largo, tienen una luz interior de 0.^{cm}5 y sirven para llenar cada una de

las secciones de la cámara. En una de las extremidades, los tubos son más delgados llegando hasta cerca de 1 milímetro de luz y en esa parte los bordes del vidrio están pulidos. En la extremidad no adelgazada se enchufa una ampolla de caucho que pasa solamente poco más allá del borde. Los esquemas para registrar los resultados de la numeración contienen únicamente los pequeños cuadrados del retículo, tal como siguen en la red de numeración. También están impresas en los esquemas, las señales que poseen algunos de estos pequeños cuadrados y que sirven de orientación en la superficie de numeración.

El esquema está dibujado en la figura 3.

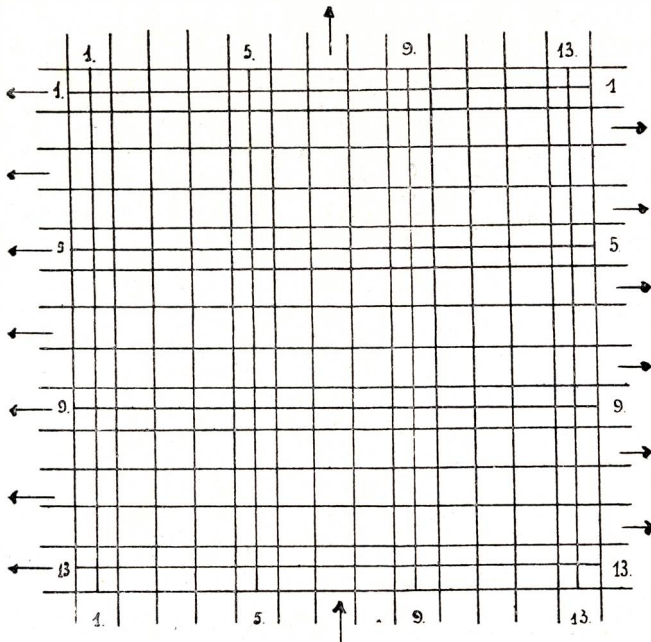


Fig. 3. — Esquema para registrar el resultado de la numeración de los hematíes ($\frac{2}{3}$ del natural).

Las filas longitudinales y transversales, en el esquema, están numeradas; cada cuadrado está netamente indicado por el número de la correspondiente fila transversal y longitudinal. Las flechas indican la dirección en la cual debe ser desplazada la cámara de numeración a fin de llevar en el campo del microscopio cada uno de los cuadrados de cada fila.

Arriba y abajo del esquema queda todavía suficiente espacio para anotaciones y referencias.

III. *Método de numeración.* — A un recuento apropiado debe preceder la limpieza de las pipetas, de los baloncitos y de la cámara, si es que no ha sido efectuada ya, después del uso inmediato anterior. Esto último debe ser la regla.

La manera de efectuar esa limpieza se indica al terminar las prescripciones sobre el empleo de cada una de las piezas.

Primeramente se coloca una pequeña cantidad de líquido de Hayem en una cápsula de vidrio con tapa; otra cápsula se llena con agua destilada. Se aspira lentamente en la pipeta para medir 4975 mm^3 de líquido de dilución, la solución de Hayem que está en la cápsula de vidrio, hasta algo arriba de la marca circular; se tapa la abertura de la boquilla de vidrio con la punta de la lengua y luego se tiene la pipeta horizontalmente. La punta de la pipeta se repasa, en sentido circular, hasta secarla, con un lienzo fino de hilo y después, tocando suave y brevemente, una o varias veces, la punta de la pipeta, con la yema bien limpia del dedo índice, se lleva el menisco del líquido de dilución, exactamente hasta la marca circular. Se introduce después la punta de la pipeta en el baloncito, cuidadosamente limpiado y mantenido oblicuamente, hasta cerca del fondo y se deja salir despacio el líquido de dilución, aplicando suavemente la yema del pulgar libre, en la picita bucal de la pipeta. La evacuación debe tardar alrededor de 40 segundos. Para la evacuación completa de la pipeta, se aplica su punta, contra la cara interna del baloncito, algo arriba del nivel del líquido, se sopla y se toquetea. Repitiendo varias veces esta misma operación se vacían los últimos restos del líquido en el baloncito y, por un suave movimiento del mismo, se reúnen los últimos restos del líquido. Sólo resta colocar el tapón de goma.

Desde este momento debe evitarse que alguna porción del líquido medido llegue al cuello del baloncito o toque el tapón.

Después de esto se lava la pipeta dos veces con el agua destilada de la cápsula y se coloca perpendicularmente, con la punta hacia abajo, en un recipiente cuyo fondo esté revestido de papel de filtro. En el caso en que la pipeta no hubiera dado parejo, en el baloncito, todo el líquido de dilución, se la limpia llenándola con ácido sulfúrico concentrado en el que se han disuelto algunos cristales de cromato de potasio y dejándola toda una noche; después se sopla el contenido y se lava la pipeta, primero con agua común y luego con agua destilada.

La extracción de la sangre, en el hombre, cuando sea posible, debe hacerse de mañana, antes que haya comido, es decir con el cuerpo y la digestión, lo más descansados posible. La sangre puede extraerse de la yema del dedo, del lóbulo de la oreja o de la vena del brazo. Si se trata de un

solo recuento se elige la yema del anular izquierdo siempre que no haya anillos demasiado ajustados que dificulten la libre circulación. Cuando hay que efectuar varios recuentos, se alterna entre el 5º, 4º y 3º dedo, siempre de la mano izquierda. Cuando se extrae del lóbulo de la oreja y ésta tiene pelo, hay que afeitar previamente.

En los animales son lugares apropiados, para la extracción de la sangre, los vasos del cuello, orejas, alas y membrana natatoria. Cuando se trata de animales inquietos o indómitos, se recoge la sangre en un block de parafina excavado, en el cual se coloca un rastro de hirudina para evitar la coagulación.

Es esencial, en cualquier caso, que se extraiga sangre circulante y no estancada.

En el hombre, antes de la extracción, debe cuidarse que la temperatura ambiente no sea menor de 17 grados centígrados, para prevenir una contracción de los vasos cutáneos. Después se limpia la piel con agua tibia y jabón, se le seca y se le desinfecta con alcohol-éter (volúmenes iguales) con el que se ha empapado un lienzo fino y limpio. Se desinfecta igualmente con alcohol-éter, el instrumento para la extracción de la sangre, cuyo filo no debe ser puntiagudo en forma de lanceta, sino ancho, a semejanza de formón, para que abra los vasos sanguíneos, en la mayor extensión posible y ofrezca a la sangre una salida sin dificultad. La longitud de la parte del instrumento a introducirse en la piel se elige en forma tal que, inmediatamente después del corte, salga una gruesa gota de sangre, sin necesidad de emplear una fuerte presión. Lo expuesto anteriormente se consigue sin dificultad alguna, cuidando, por medio de una pequeña piedra de aceite, que esté siempre agudo el filo del instrumento. En nada perjudica, por otra parte, una suave presión en el dedo, siempre que ésta se ejerza en la primera falange y no en la yema. Puede también obtenerse una fácil salida de la sangre, separando los labios de la herida. Cuando la sangre se extrae de la vena del brazo se utiliza una aguja y se recibe en un block de parafina.

Mientras que la parte del cuerpo, de la cual debe extraerse la sangre, se mantiene en forma que la circulación sin trastorno, se aplica el filo del instrumento de Francke-Bürker, en lo posible, perpendicularmente a la marcha de los vasos, se hace el corte y se seca completamente la primer gota de sangre. La yema del dedo se lleva entonces a la altura del corazón. La punta de la pipeta de medición de 25 ^{mm}3, se introduce en el centro de la gota siguiente, teniéndola lo más perpendicularmente posible y se aspira la sangre hasta que el menisco coincida con el plano o promine algo arriba de la marca circular de la pipeta. Se seca después

la punta de la pipeta, sin tocar la abertura y se observa si la columna sanguínea alcanza realmente desde la punta hasta la marca circular. Si el menisco ha pasado algo más arriba de dicha marca, se le trae exactamente, al pelo, con ella, para obtener lo cual, basta tocar la punta de la pipeta, suave y rápidamente, una o varias veces, con la yema bien limpia del dedo índice libre. También puede emplearse una lente para determinar la posición exacta del menisco de sangre en la marca circular.

Cuando se emplea la aguja cánula, debe suspenderse la presión de la vena antes de dejar salir la sangre que va a utilizarse.

Una vez medida la sangre con precisión y quitada la que ha quedado adherida, por fuera, a la pipeta, se introduce ésta con la punta en el líquido de dilución que ya está medido en el baloncito de mezcla, donde va inmediatamente al fondo, soplando lentamente y de tal forma que no se produzcan burbujas de aire. Se aspira luego, líquido de dilución puro, del mismo baloncito, se lo sopla de nuevo y en la misma forma y, se repiten estas operaciones. Hecho esto se tapa de nuevo el baloncito. Se efectúa ahora la mezcla de la sangre con el líquido de dilución haciendo girar el baloncito durante un minuto, alternativamente, en el sentido de las agujas de reloj y en sentido contrario y dando algunas vueltas espirales, de radio cada vez más pequeño, pero teniendo cuidado que la dilución no salga de la parte esferoidal y toque el cuello o el tapón del baloncito. Efectuada así la mezcla, se introduce la pipeta de sangre en la sangre diluida y se limpia una vez más con ella, en lo posible sin producir burbujas. Tenemos así la sangre diluida 200 veces.

La limpieza de la pipeta de sangre se hace lavándola primeramente varias veces con agua destilada y se observa, si en el interior, cerca de la marca circular, se ha precipitado algo de fibrina, pues esto ocurre con frecuencia. Si así ha sucedido, se saca inmediatamente esa fibrina con una crin de caballo que ha sido desgrasada con éter y que se ha guardado limpia. Se pasa en la pipeta todavía, varias veces con agua destilada y se seca el espacio interior de la misma, aspirando alcohol-éter, que se expulsa después y luego con la boca se aspira aire con objeto de secarla, pero no se sopla. Acto seguido se coloca la pipeta verticalmente, con la punta hacia abajo, en el recipiente que contiene la pipeta para líquido de dilución. En las dos pipetas, el tubo de goma para aspiración, que está enchufado en ellas, queda doblado hacia abajo e impide así la entrada de polvo al interior de la pipeta. De tiempo en tiempo, la pipeta de sangre y el balón de mezcla deben limpiarse cuidadosamente con ácido sulfúrico concentrado, en el que se ha disuelto un poco de bicromato de potasio.

Las celdas de numeración se limpian con agua destilada y con alcohol-éter de la manera siguiente: primero se empapa con agua destilada un pañuelito fino y con él se limpia suavemente la superficie de numeración y el porta-objetos, después se humedece otro pañuelo con alcohol-éter y se limpia una vez más. El alcohol-éter nunca debe llegar a la cámara en forma de gotas a fin de que no sufra el cemento que la une al porta-objetos. Se seca luego la cámara con un lienzo sin hilachas y con el cubre se colocan sobre un fondo negro, libre de polvículo. Después se desliza el cubre con los dos pulgares mientras que los dos índices lo comprimen suavemente contra el soporte y se aprieta con las dos grampas hasta que aparezcan, en toda la región, los colores de Newton, debajo del cubre.

Terminado esto, la cámara se coloca horizontalmente y, como ya está en condiciones de llenarse, se mezcla cuidadosamente durante un minuto, la sangre diluída; se dirige el baloncito con el tapón hacia el operador, lo más aproximado posible de la cámara, que está colocada sobre un fondo negro y se espera hasta que el enturbiamiento nebuloso se transforme en homogéneo. Retirado el tapón, se toma una pipeta de transvasación, se efectúa una ligera presión en el capuchón de goma y se introduce la punta en la sangre diluída suspendiendo suavemente la presión, lo que determina que una parte de la sangre diluída suba lentamente en la pipeta: luego se retira con cuidado y sin retardar se lleva la punta de la pipeta sobre la parte saliente de la superficie de numeración se ejerce una ligera presión en la gomita hasta que la sangre diluída toque apenas el cubre-objetos y se deja de apretar. La repleción de la cámara se efectúa instantáneamente. Si la pipeta se maneja en forma apropiada, es suficiente el calor que da la mano para hacer salir una pequeña gota de mezcla sanguínea. Usando la otra pipeta de transvasación y en igual forma, se llena la segunda sección de la cámara pero es necesario antes, mezclar de nuevo, durante un minuto, la sangre diluída.

Hay que dejar en reposo la cámara durante uno o dos minutos, para que los hematíes se depositen en la superficie de numeración. Apesar de esto, en una pequeña proporción (alrededor del 0,4 por ciento) quedan adheridos a la cara inferior del cubre.

Mientras se depositan los hematíes se limpia la pipeta de transvasación, en su extremidad adelgazada, haciendo entrar y salir varias veces, agua destilada por medio de la perilla de goma; el resto del agua se elimina con alcohol-éter y se seca el interior por medio de corriente de aire aspirada. De tanto en tanto se aconseja una limpieza mecánica por medio de una pluma y una limpieza química con ácido sulfúrico concentrado al que se le ha agregado un poco de bicromato de potasio.

Teniéndola lo más horizontalmente posible, se pasa la cámara a la platina del microscopio; no hay peligro de desplazamiento de los glóbulos rojos, una vez depositados.

Antes de comenzar la numeración debe comprobarse si los hematíes están uniformemente distribuidos sobre la superficie de numeración, iluminando esta última, desde abajo, por medio del espejo del microscopio y abriendo totalmente el diafragma. Se ve entonces a simple vista y desde el costado, sobre la superficie de numeración, un enturbiamiento amarillento proveniente de los hematíes. Una mala distribución se manifiesta inmediatamente porque el enturbiamiento no es regular; en este caso debe llenarse de nuevo la cámara.

Las pequeñas burbujas de aire, fuera de la red de numeración, no incomodan, si no han tenido mala influencia sobre la distribución de los glóbulos. Si una sección está bien llenada y la otra mal, se numera en la primera antes de llenar de nuevo la cámara.

Para la numeración que se practica a la temperatura del laboratorio, es indispensable un Chariot en cruz (con dos movimientos) que permita desplazar la platina en dos direcciones perpendiculares entre sí. La iluminación debe ser buena y siempre uniforme. El diafragma iris, debajo del condensador, se deja poco abierto para que resulten bien visibles, las estrias del diamante que forman la red. En los microscopios sin condensador se utiliza un diafragma iris de cúpula o un diafragma cilíndrico. Debido al espesor del cobre que lleva la cámara no debe elegirse un objetivo de mucho aumento. Por medio de un fuerte ocular, se trata de alcanzar el aumento deseado, que conviene sea, más o menos de 300 diámetros.

(Objetivo Zeiss C $\frac{20}{16}$ [20X] y ocular Huygens 3 a 5 [7X, 10.e. 15X])

Ya con el objetivo DD, no es posible ver los cuadros marginales porque lo impiden las grampas del aparato.

Si se enfoca el microscopio solamente sobre la superficie de numeración, se pasan por alto los hematíes adheridos al cobre, que, como se ha dicho, constituyen el 0,4 por ciento.

Se comienza la numeración en el ángulo superior izquierdo del retículo, se cuentan los hematíes solamente en los pequeños cuadrados siguiendo la fila de que ya se habló y teniendo presente que los linfocitos son casi iguales, en tamaño, a los hematíes, pero son incolores y levantando el tubo del microscopio brillan fuertemente. Se anota luego el número encontrado en el cuadro correspondiente del esquema.

En cada cuadrado se cuentan todos los hematíes que están alojados libremente en el interior del mismo y además los que cubren o tocan, de adentro o de afuera el borde superior y el derecho mientras que no deben con-

tarse los que cubren o tocan, de adentro o de afuera el margen izquierdo y el inferior. Tampoco se cuentan los hematíes que simultáneamente cubren o tocan el canto superior e izquierdo o el canto inferior y derecho.

Por lo expuesto se deduce, que se cuenta, como si fuera en un cuadrado que se hubiese desplazado hacia adelante y a derecha en una amplitud igual al diámetro de un glóbulo rojo.

Como borde o margen se considera la línea del medio de las tres, que en la imagen, limitan el cuadrado y que se forman porque ópticamente se marcan los dos bordes y el fondo de la ranura trazada por el diamante.

Se considera que hay contacto con la línea media cuando esta aparece ligera y regularmente arqueada por los hematíes.

Esta prescripción para la numeración o no numeración de los hematíes resulta de la explicación siguiente.

Sobre un papel, dividido en mm², se dibujan una serie de cuadrados más grandes, iguales unos a los otros, y se coloca simétricamente en cada uno de ellos, cuatro corpúsculos (fig. 4).

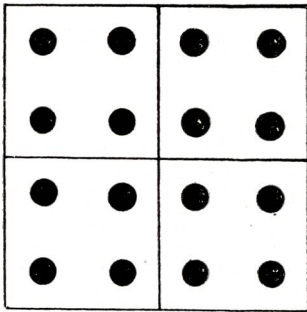


Fig. 4



Fig. 5

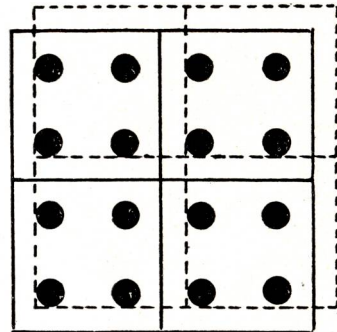


Fig. 6

Sobre un papel transparente se pasan las líneas divisorias de uno de estos cuadrados (fig. 5) y se coloca este sobre el papel cuadrículado, desplazándolo paralelamente a los cuadrados situados debajo y que se ven a través del papel. En la numeración correcta, que consiste como se ha dicho en contar los hematíes, como si estuvieran en un cuadrado desplazado hacia arriba y derecha en una extensión igual al diámetro de un glóbulo rojo, se observa en cada posición, cuatro corpúsculos por cuadrado (fig. 6).

De esta demostración resulta que los dos hematíes señalados en la figura 6 no deben contarse aunque ellos toquen desde afuera, uno el borde superior y el otro el borde derecho.

El eje simétrico es la línea dibujada SS., todo lo que arriba y a dere-

cha de ella toca los bordes, debe contarse; todo lo que abajo y a izquierda cubre o toca los bordes no debe contarse.

Como el eje divide a los hematíes dibujados, en partes iguales, en $+$ y en $-$ (positiva y negativa; lo que se cuenta y lo que no se cuenta) la suma algebraica queda nula.

Por las mismas razones debe contarse el hematíes $+$ de la figura 7 y no debe contarse el hematíe $-$.

En el recuento el operador debe acostumbrarse a abarcar por grupos, en el interior de los cuadrados y no numerar aisladamente cada uno de los hematíes de un grupo; se trabaja así más rápido y más seguro. Es típico por ejemplo un hematíe rodeado de otros cuatro, así que, con la mirada esa imagen $\begin{bmatrix} \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot \end{bmatrix}$ expresa inmediatamente el número 5.

Después de la anotación del resultado numérico en el correspondiente cuadrado de esquema, se pasa rápidamente la mirada, una vez más, en el cuadrado de la superficie de numeración con objeto de controlar, antes de efectuar el recuento en un nuevo cuadrado.

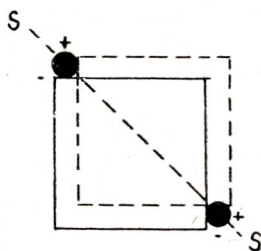


Fig. 6

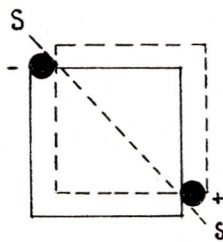


Fig. 7

En la sangre diluida 200 veces, se numeran siempre 80 cuadrados o un múltiplo de 80 y siempre, del total de estos, la mitad en una de las secciones y la otra en la segunda sección de la cámara.

Se empieza siempre la numeración en el ángulo superior izquierdo del retículo, de manera que este ángulo corresponde, en una de las secciones de la cámara al punto de entrada de la sangre diluida y en la otra en el sitio opuesto.

Cuando se trata de investigaciones muy precisas se cuentan dos veces 80 cuadrados en cada sección de la cámara, es decir, 320 cuadrados en total.

Si se suman en serie lineal los resultados numéricos anotados en los cuadrados del esquema, se comprueba si los hematíes, estaban distribuidos uniformemente, dentro de los límites requeridos.

El cálculo es sumamente sencillo, cuando se cuentan en la forma descrita 80 cuadrados puesto que solamente hay que multiplicar por 10.000.

el resultado numérico obtenido. Si por ejemplo se han contado en 80 cuadrados, 536 hemáticos, en sangre diluída al 1 por 200; en 1 mm³ de sangre habrá 536 × 10.000, es decir, 5, 36 millones.

La capacidad de uno de los cuadrados pequeños, que son en donde se cuentan, es de 1/4000 de mm³, el volumen contado en 80 cuadrados es de 80/4000 mm³ igual a 1/50 de mm³. Un mm³ de la sangre diluída contiene entonces 50 veces más y un mm³ de sangre pura 50 × 200 = 10.000 veces más hemáticos de los que se contaron en 80 cuadrados, ya que la sangre ha sido diluída 200 veces. Si se cuenta un múltiplo « m » de 80 cuadrados, se divide entonces primero el número total encontrado en la numeración por « m » y después también por 100, para tener el total expresado en millones.

No hay ningún objeto, al expresar el número de hemáticos en millones, de dar más de dos cifras decimales, porque el término medio de las fallas de numeración, importa varias unidades de este último decimal.

El siguiente cuadro demuestra las fallas que se observan, con relación al número de cuadrados contados y al número de las numeraciones, cuando se han evitado todas las causas de error en la extracción de la sangre, dilución de la misma y recuento de los hemáticos.

Número de los cuadrados contados	Promedio de error	
	Del valor medio en 7 numeraciones por ciento	De cada numeración independiente por ciento
80	3,6	1,4
160	2,5	0,9
320	1,8	0,7

Si el recuento durase largo tiempo, se moja con agua destilada, el papel de filtro de la cámara húmeda y se rodea con ella la cámara de numeración, para impedir así la evaporación del agua, que pronto se produce, si se deja la cámara sin esa protección.

Si debiera interrumpirse la numeración, se levanta el tubo del microscopio, se rodea la cámara de numeración con la cámara húmeda y se cubre esta con su correspondiente tapa, después de haber humedecido su revestimiento de papel. En las circunstancias habituales no hay necesidad de usar la cámara húmeda.

Inmediatamente después de efectuada la numeración se limpia cuidadosamente la cámara y se deja montada para poder emprender en cualquier momento un nuevo recuento.

Si se tiene que numerar hemáticos grandes como los de la sangre de los

anfibios y reptiles se debe aumentar el alto de la cámara empleando el cubre que tiene una canaleta de 0, 1 mm. de profundidad, como se usa en el recuento de los leucocitos. La cámara tiene así 0, 2 mm. de altura.

La sangre se diluye, según las circunstancias, solamente 100 veces para lo cual se necesita una pipeta de 2475 mm^3 para líquido de dilución y se cuenta en los cuadrados grandes de $16/400 \text{ mm}^2$ de superficie y de $1/125$ de mm^3 de capacidad. Deben contarse 125 cuadrados grandes. El número obtenido se multiplica por 100 y se obtiene el total en 1 mm^3 de sangre.

Para investigaciones muy prolijas, tanto en este como, por otra parte en todos los casos, se deben contar por lo menos 2000 hematíes, puesto que las fallas del número total en dos numeraciones, están entre sí en razón inversa de la raíz cuadrada del número de hematíes contado.

INSTRUCCIONES PARA EL RECUENTO DE LOS LEUCOCITOS
DE LA SANGRE SEGÚN BÜRKER

I. *Características del método.* — En la numeración de los leucocitos debe tenerse en cuenta que estos elementos se encuentran en mucho menor número y que tienen más o menos el doble tamaño que los hematíes. La cámara de numeración debe adaptarse a estas circunstancias tal como sucede para con los hematíes de gran tamaño.

II. *Aparato.* — La adaptación anteriormente mencionada se satisface, no con el cubre común, sino con otro provisto de una canaleta de 0, 1 mm. de altura de tal suerte que el alto de la cámara importa así 0, 2 mm., es decir, el doble que en la numeración de los hematíes. Los leucocitos se cuentan en los cuadrados grandes del retículo (fig. 2) de $16/400$ de mm^2 igual a $1/25$ de mm^2 (en la fig., por el aumento de 20 veces resultan de 16 mm^2) los cuales están separados entre sí por los rectángulo de $4/400$ de mm^2 (en la fig. 4 mm^2).

En cada superficie de numeración hay 144 cuadrados grandes.

La pipeta para medir 25 mm^3 de sangre es la misma que para los hematíes. La pipeta para medir el líquido de dilución tiene una capacidad de 475 mm^3 , de manera que cuando se agrega a este los 25 mm^3 de sangre, la dilución es exactamente al vigésimo. Como líquido de dilución se emplea la solución de Türk mejorada, que responde a la siguiente fórmula :

	Centímetros cúbicos
Acido acético.....	0,5
Agua destilada.....	150,
Solución de violeta de genciana al 1 por ciento en agua destilada.....	1,5

El baloncito para la mezcla de la sangre y del líquido de dilución es mucho más pequeño; el aparato trae dos de estos baloncitos (fig. 1 a' y b').

Las pipetas de transvasación son las mismas.

El esquema para la anotación de los resultados numéricos obtenidos está dibujado en la figura 8. En él se reproducen solamente los cuadrados grandes del retículo (fig. 2) de $1/25$ de mm^2 que son aquellos en los cuales deben cortarse los leucocitos. Los cuadrados pequeños y los rectángulos intermediarios están representados por rayas finas; las rayas gruesas separan entre sí, uno de otro, grupos de 16 cuadrados grandes, en la misma forma, como en la superficie de numeración, separan grupos análogos, los

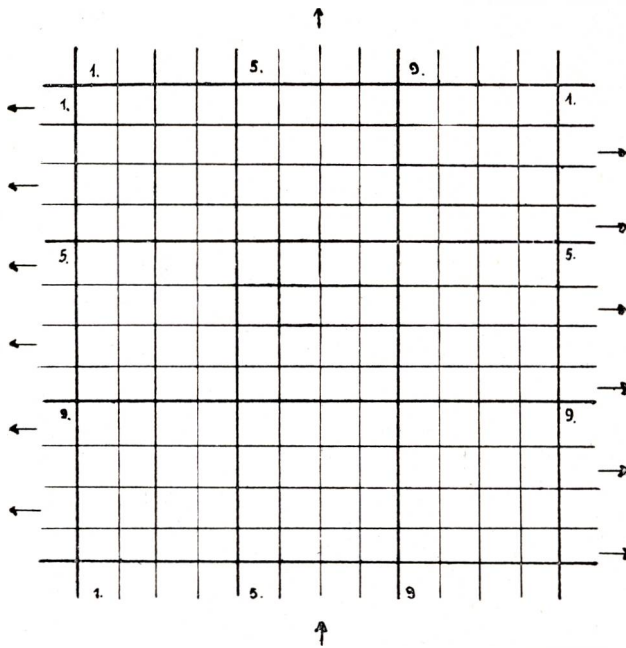


Fig. 8. — Esquema para registro del resultado numérico de los leucocitos ($\frac{2}{100}$ del natural).

pequeños cuadrados y los rectángulos provistos de señas talladas con fines de orientación.

Los números del esquema sirven para numerar las filas longitudinales y transversales; las flechas indican la dirección en la cual debe ser desplazada la cámara para llevar cada cuadrado, según la serie, en el campo visual del microscopio.

III. *Método de numeración.* — El procedimiento para la dilución de la sangre, la manera de llenar la cámara y su numeración son, en principio,

los mismos que en el recuento de los hematíes, solamente hay que tener especial cuidado aquí que, los baloncitos con la sangre diluida no queden abiertos inutilmente y no olvidar que los leucocitos quedan facilmente adheridos a la cara inferior del cubre; se debe enfocar, por lo tanto, subiendo y bajando el tubo del microscopio.

El espacio sobre un cuadrado grande es igual a $1/125$ de mm^3 . Se cuentan 125 cuadrados en cada una de las secciones de la cámara y basta entonces multiplicar el número total obtenido por 10 para obtener el número de leucocitos en un milímetro cúbico de sangre.

Cuando se trata de numeraciones muy prolijas se llena la cámara una segunda vez y se cuenta de nuevo en ambas secciones.

Se deben contar en total alrededor de 2000 leucocitos.

Al dar el cómputo por mm^3 se debe evitar, también aquí, de dar más cifras que las que ofrecen seguridad. Así, por ejemplo, en lugar de decir que hay 8122 leucocitos debe decirse 8,12 millares.

Hay una dificultad en el recuento de los leucocitos de la sangre de los animales que poseen hematíes nucleados. Los hematíes son disueltos por el ácido acético pero sus núcleos quedan y son difíciles de diferenciar de los leucocitos. Esta dificultad, hasta ahora, no ha podido ser salvada en los métodos de las cámaras pequeñas de numeración.

Abstracción hecha de este inconveniente, el método descrito, ya se lo emplee para la numeración de los hematíes, ya para la de los leucocitos, es ventajoso porque: 1° la sangre diluida puede ser transportada fácilmente, para lo cual tendría aplicación un estuche especial; 2° el montaje y el rellenamiento de la cámara se efectúan con exactitud; 3° se practican numeraciones de contralor en las dos secciones de la cámara, después de llenadas independientemente, pero en la misma aplicación del cubre; 4° pueden conservarse como documentación, los esquemas con los números registrados.

(Continuará.)