

13724



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**METODOS AUTOMATIZADOS EN  
HEMATOLOGIA**

**TRABAJO ESCRITO**  
**VIA DE EDUCACION CONTINUA**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**  
**P R E S E N T A ;**  
**JOSUE VERA ORTEGA**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

México, D. F.

1991



## **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 está 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.

**I N D I C E****I.- INTRODUCCION****II.- GENERALIDADES****III.- BREVE HISTORIA DE LOS METODOS AUTOMATIZADOS****IV.- FUNDAMENTOS Y APLICACIONES****V.- BIBLIOGRAFIA**

## I N T R O D U C C I O N

En el transcurso de los últimos años se ha notado un aumento progresivo de los análisis rutinarios realizados por los laboratorios clínicos. Los problemas ordinarios y prácticos que ello ocasiona, ha dado auge al desarrollo de las técnicas automatizadas por lo que se ha presenciado un incremento continuo en la eficacia y utilidad de los aparatos automáticos que se ha traducido en una disponibilidad y utilización siempre creciente de la instrumentación automatizada, la mayor parte de este equipo es muy costoso; no obstante la eficacia perfeccionada ha tendido a disminuir los costos generales de las pruebas de laboratorios, además los resultados así obtenidos demuestran una disminución de los errores metodológicos, aumentando por tanto la calidad de los exámenes. Antes del advenimiento de los instrumentos automatizados, las determinaciones más frecuentes en el laboratorio de hematología eran la determinación de hemoglobina, el valor de hematócrito, el recuento leucocitario y la valoración microscópica de la extensión de la sangre teñida, otras determinaciones menos frecuentes incluían el recuento eritrocitario, reticulocitos y plaquetas y una serie de índices que se derivan del recuento de los glóbulos rojos. De estas pruebas sólo la hemoglobina y el valor de hematócrito pueden realizarse mediante técnicas manuales de forma simple y rápida. Por lo contrario, los métodos manuales de recuento celular han sido engorrosos y pesados e implican menor grado de precisión.

En un estudio, el recuento de los glóbulos rojos expresaba un coeficiente de variación de 28.2 por ciento. Probablemente, en laboratorios con mucha carga de trabajo, los recuentos cotidianos dé un coeficiente de variación más alto, la variabilidad en el recuento manual de las plaquetas y leucocitos es semejante.

La falta de precisión en el recuento de glóbulos rojos, - tiene un efecto secundario en dos de los índices eritrocíticos: La hemoglobina corpuscular media y el volumen corpuscular medio, ya que ambos se derivan del recuento eritrocitario. Cuando ocasionalmente se practican recuentos celulares repetidos - ya sea por técnicas manuales o por técnicas automáticas las - variaciones observadas entre los diferentes resultados siguen teóricamente la distribución de Poisson. Una característica de tal distribución, es que la desviación estandar de las repetidas observaciones, es igual a la raíz cuadrada del número medio de las células contadas en cada observación; por ello lo - ideal sería contar un número elevado de células a fin de conseguir un grado de precisión más alto.

Para lograr por ejemplo un coeficiente de variación del 2 por ciento se tendría que numerar por lo menos 2500 glóbulos rojos, entonces resulta obvio que las técnicas automatizadas - permiten un recuento de cifras mucho mayores que las conseguidas por los métodos manuales, otra consideración, es que al - aumentar el número de células contadas existen mayores probabilidades de que dos o más células sean interpretadas por un dispositivo detector, produciendo un error progresivo debido a coincidencias. Se requiere pues técnicas que disminuyan y/o corrijan "los errores de coincidencia" de los contadores automáticos.

## GENERALIDADES

El análisis de la sangre periférica se realiza en todos los pacientes que padecen enfermedades importantes, debido al gran valor que posee el hallazgo de una anemia, o una leucocitosis, se puede determinar una extensa gama de anomalías en la sangre periférica mediante estudios cuantitativos o cualitativos. Se cuenta en todos los laboratorios de análisis clínicos con procedimientos básicos o de rutina, que permiten en la mayoría de los casos, una orientación diagnóstica bastante aproximada a la realidad clínica del paciente. Por lo que respecta a la hematología, existe lo que se conoce con el nombre de biometría hemática, la que se encarga del estudio de los elementos formes de la sangre. Dicho estudio se puede dividir en fórmula roja y fórmula blanca. La primera incluye la cuantificación de hemoglobina, número de eritrocitos, el valor de hematocrito, así como los índices hematológicos; la concentración media de hemoglobina globular (CMHG), hemoglobina corpuscular media (HCM) y el volumen corpuscular medio (VCM). La fórmula blanca comprende el número de leucocitos y su cuenta diferencial.

Existen para los diferentes parámetros de la fórmula roja procedimientos tanto manuales como automatizados.

## DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE HEMOGLOBINA

La hemoglobina es una sustancia intensamente colorida y - ésta propiedad es aprovechada en el laboratorio para su determinación.

La hemoglobina circulante en la sangre es una mezcla de hemoglobina, oxihemoglobina, carboxihemoglobina, metahemoglobina y cantidades menores de otras formas de este pigmento.

Para medir correctamente este componente sanguíneo, es necesario disponer de un derivado estable que englobe todas las formas de hemoglobina en la sangre, los derivados cianometahemoglobina, hemoglobina cianada y cianoferrihemoglobina, son de fácil preparación, todas las formas de hemoglobina circulante son rápidamente convertidas en cianometahemoglobina, excepto - la sulfohemoglobina, la cual raramente alcanza niveles importantes.

La cianometahemoglobina puede medirse con precisión a 540 nm.

El fundamento de esta prueba consiste en que la sangre se hemoliza por el agregado de un agente tenso activo (bicarbonato de sodio) con el ferricianuro de potasio se oxida el átomo ferroso a férrico para producir metahemoglobina. el cianuro de potasio estabiliza la metahemoglobina como cianometahemoglobina, - la coloración es directamente proporcional a la concentración de hemoglobina presente.

## HEMATOCRITO

La proporción del volumen sanguíneo que ocupan los eritrocitos (hematócrito) puede determinarse mediante una centrifugación capaz de compactar a los hematíes en el menor volumen posible. Este parámetro se expresa en valores porcentuales. El volumen de plasma que queda entre la masa globular - empaquetada suele ser del 1 al 4%.

Con el fin de determinar el hematócrito es necesario usar un anticoagulante que no modifique el volumen de los eritrocitos de manera importante como la heparina, o una mezcla de oxalato potásico, amónico o dipotásico, así como EDTA.

Este índice puede ser medido en una escala "macro", centrifugado a relativamente pocas revoluciones; o una escala "micro" mediante tubos capilares y alta velocidad de centrifugación. Los errores que surgen en esta determinación del valor hematócrito se deben a los cambios provocados en el volumen celular durante las preparaciones previas a una mezcla - incorrecta, una centrifugación y/o tiempo inadecuados.

El coeficiente de variación del índice hematócrito determinado por centrifugación es de 1-2%.

Algunos sistemas automatizados calculan el hematócrito - en base del recuento eritrocitario y el volumen corpuscular - medio o lo estiman por mediciones de conductividad.

## RECIENTOS CELULARES

La determinación numérica de eritrocitos, leucocitos y plaquetas ha sido durante mucho tiempo fundamental en hematología. Anteriormente el recuento eritrocitario no se realizaba como un procedimiento corriente debido fundamentalmente a las limitaciones técnicas.

Sin embargo el reciente desarrollo de los contadores celulares electrónicos ha renovado el interés hacia el recuento eritrocitario.

A fin de obtener unos datos cuantitativos verdaderos, el número de células en una muestra sanguínea perfectamente medida y diluida debe dar un recuento reproducible.

El procedimiento tradicional de recuento celular consiste en que se usa una pipeta de Thoma o una variante de esta.

La pipeta es un tubo capilar graduado que tiene un bulbo en su porción terminal superior donde la sangre es diluida hasta una marca. La dilución depende de la concentración de las partículas a enumerar, ordinariamente se tiene una dilución de 1:20 (V/V) para los leucocitos y la dilución de 1:100 para las plaquetas excepto cuando se presenta una trombocitopenia, se emplea una dilución de 1:20.

El diluyente para los eritrocitos es una solución isotónica tal como el líquido de Hayem, para los leucocitos es líquido de Turk, hemolizante que se emplea para destruir los eritrocitos, y para las plaquetas oxalato de amonio que hace que los eritrocitos y las plaquetas se vean refringentes.

Después de mezclar las células con su respectivo diluyente se deposita un volumen determinado en la cámara de Neubauer.

La cámara de Neubauer permite examinar un volumen fijo a través de una rejilla grabada en la base de la cámara cuya profundidad es constante. Se examina al microscopio este volumen y se procede a enumerar los elementos que se encuentran distribuidas en el retículo de la cámara y mediante una operación matemática se obtiene el número de células.

#### ANTECEDENTES HISTORICOS DE METODOS AUTOMATIZADOS

Uno de los primeros ensayos sobre el método ideado por W.H. Coulter (1956) provee una buena descripción del principio básico del método Coulter.

El instrumento empleado es un sistema provisto de un registrador y un valuator del conteo para un flujo continuo de 6000 células individuales por segundo, con un intervalo entre cada conteo de 15 segundos.

Una suspensión de células sanguíneas pasa a través de un pequeño orificio donde simultáneamente se aplica una corriente eléctrica, generada por 2 electrodos de platino. El paso individual de las células sanguíneas a través del pequeño orificio introduce un cambio en la resistencia eléctrica.

El número de células contadas por muestra es aproximadamente 100 veces más rápido que el conteo microscópico usual y reduce el error estadístico por un factor aproximado de 1 a 10 veces.

Se mejoró sustancialmente la precisión sobre los métodos estadísticos previamente establecidos ayudando con esto a dar una mejor reproducibilidad en el conteo eritrocitario, particularmente cuando se considera simultáneamente la medida del hematócrito y la hemoglobina.

El "Coulter Counter" modelo S fué el primer instrumento totalmente automatizado el cual mide simultáneamente un gran número de parámetros sanguíneos, su funcionamiento y valor clínico fueron mejorados por Brittin (1969) y Davison y por Gottman Hamilton y Davison los cuales proponen que el mejoramiento del Coulter provee un dato más preciso de la distribución del volumen, y un valor de hematócrito más adecuado ya que

no se ve involucrado el error introducido por el plasma como lo es en la medida del hematócrito por centrifugación.

El uso del Counter Coulter para contar plaquetas fue descrito y desarrollado por Bull (1965). Pero este método fué útil solamente en preparados de plasma ricos en plaquetas, en el orden en que cuentan los eritrocitos se podían contar las plaquetas, Mund Schek (1976) y Schult y Tlam (1973) indicaron la posibilidad de contar plaquetas directamente, esto es en presencia de eritrocitos, clasificándolos por el volumen.

Estos métodos hidrodinámicos para aumentar la precisión y exactitud en la medición fué mejorado en el modelo S-Plus por refinamiento electrónico.

La operación del modelo S-Plus III requiere el uso de reactivos, los cuales tendrán propiedades bien controladas, un diluyente (ISOTON PLUS) que consiste en una solución electrolíticamente bien balanceada que contiene sulfato de sodio anhidro, cloruro de sodio, dimetil urea clorhidrato de procaina que funciona como preservadora de la integridad de las células y como líquido conductor del medio de suspensión.

El diluyente se requiere para la suspensión de los eritrocitos, leucocitos y plaquetas en una muestra de sangre, suficiente para minimizar las posibilidades de que haya más de una célula al mismo tiempo en una apertura.

El modelo S-Plus III corrige esta coincidencia automáticamente, entonces, el volumen celular es medido y el efecto de la ósmosis y otros fenómenos son controlados por el diluyente. El diluyente no contiene sustancias que propicien el desarrollo de bacterias.

El conteo de leucocitos y el proceso de la medición de la hemoglobina, requiere simultáneamente de la destrucción rápida del eritrocito y la conversión de la hemoglobina a un compuesto estable, mientras que el núcleo de los leucocitos queda intacto. Esto es posible por la acción de un agente lisante (LYSES) el cual no contiene un significativo número de partículas contables y que causa hemolisis, por tal camino se hace invisible electrónicamente el estroma celular, los ingredientes activos en este reactivo son sales cuaternarias de amonio y cianuro de potasio.

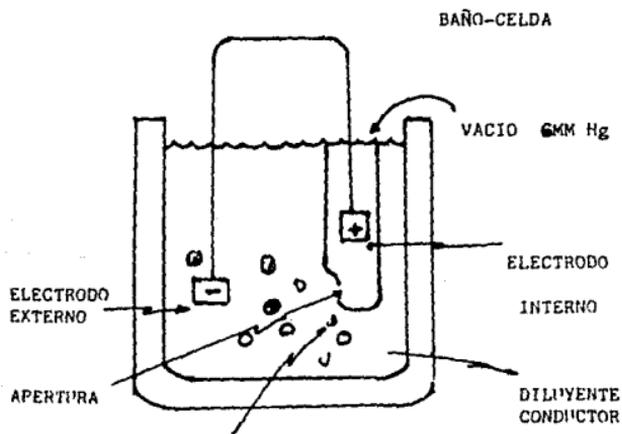
El agente lisante libera la hemoglobina por hemolisis, para así convertirla en un pigmento estable por medio del cianuro, la absorción del cual es directamente proporcional a la concentración de la hemoglobina en la muestra.

Este método de medición de la hemoglobina ha sido aceptado para introducirlo en el método Coulter Counter modelo S (1968), este ha sido extensivamente evaluado para correlacionarlo entre el método Coulter Counter y el de Ciano-metahemoglobina recomendado por el Comité Internacional de Estandarización en Hemoglobina, por expertos del panel de hemoglobinometría y por la Organización Mundial de la Salud.

FUNDAMENTOS Y APLICACIONES  
MÉTODO COULTER  
(Modelo S/Plus IV)

El "Counter Coulter" es un aparato para el recuento de las células por cambio en la resistencia eléctrica. El principio Coulter para el recuento de las células y la asignación de su tamaño se basa en la detección y medición de los cambios en la resistencia eléctrica producido por una partícula en un líquido conductor al cruzar una pequeña apertura.

A medida que la suspensión de células diluidas pasa a través de las aperturas, el paso de cada célula individual momentáneamente aumenta la resistencia de la trayectoria eléctrica entre dos electrodos sumergidos, ubicados a cada lado de la apertura, lo cual genera una variación en el voltaje que es detectada en un osciloscopio como pulsos eléctricos.



DILUCION CONOCIDA DE CELULAS

Mientras que el número de pulsos indica el recuento de partículas, la amplitud del pulso eléctrico producido depende del volumen de la célula. (Fig.1a.).

Distintos tipos de células son clasificados electrónicamente mediante los pulsos que generan, cada pulso es sorteado de acuerdo a su tamaño.

Se pueden transmitir estos pulsos a un analizador de canales y construir un histograma de volumen mediante esta información canalizada. (Fig.1b).

Este resulta en un histograma de volumen celular.

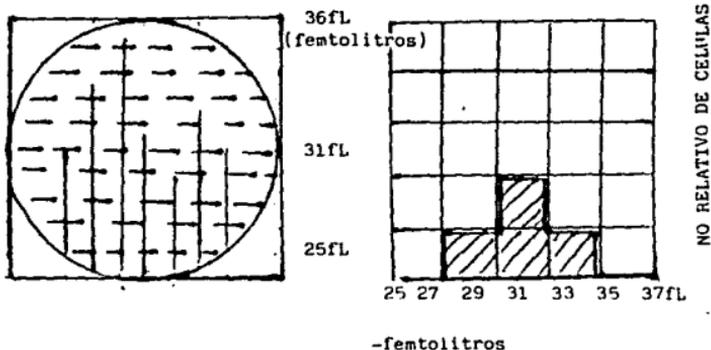


Fig. 1a Osciloscopio  
Donde se registran los pulsos  
producidos por el tamaño de las  
células.

Fig. 1b Histograma de Volumen  
celular, construido a partir de los pulsos que  
generan las células cuando pasan  
a través de una apertura.

Los histogramas de leucocitos, eritrocitos y plaquetas - proveen datos sobre el tamaño promedio de las partículas; la distribución de partículas sobre el tamaño medio y la presencia de subpoblaciones.

De la información de leucocitos y el uso de los histogramas, se puede obtener el porcentaje y el número absoluto de - tres clases de células, los linfocitos, la población de células mononucleares y la población de células polimorfonucleares

También del histograma se evalúan, los parámetros de eritrocitos, y un nuevo parámetro para eritrocitos ADE o ancho - de distribución de eritrocitos.

Del histograma de plaquetas se interpretan casos con problemas de recuento y morfología anormal y se introduce un nuevo parámetro VPM o volumen plaquetario medio.

#### EL HISTOGRAMA

Se refiere a:

- Volumen medio de partículas en una población.
- Distribución de partículas a ambos lados de la media.
- Subpoblaciones.

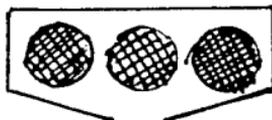
Los analizadores serie Coulter S-PLUS utilizan dos juegos de tres aperturas cada una para contar células.

Las tres aperturas de eritrocitos tienen un tamaño de 50 x 60 micrones, el contenido del recipiente de leucocitos - es transferido a una cubeta-celdilla donde la hemoglobina es determinada espectrofotométricamente.

APERTURA DE  
ERITRODICTOS (50 x 60 Mm)



APERTURA DE LEUCOCITOS  
(100 x 75 Mm)

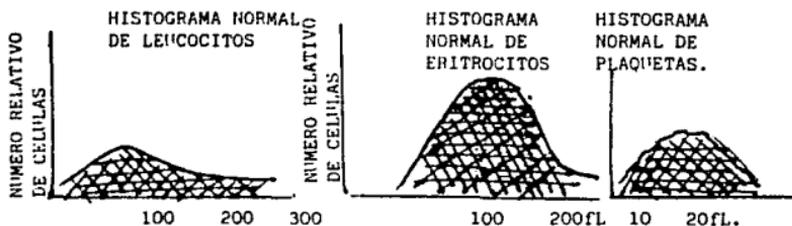


SISTEMA DE APERTURA: Cada juego consta de tres aperturas para el conteo de eritrocitos y otro para leucocitos.

Ciertos parámetros hematológicos son medidos directamente y, de éstos, otros son calculados. De las aperturas de eritrocitos, son determinados recuentos de eritrocitos, volumen de eritrocitos, recuento y volumen de plaquetas. En la parte de leucocitos son medidos recuento de leucocitos y volumen. La concentración de hemoglobina es medida también en esta cubeta.

De los parámetros de eritrocitos directamente medidos se obtienen: hematócrito, los índices de Wintrobe (HCM y CHCM), además del ADE y por medio del histograma de leucocitos se genera el porcentaje y número absoluto del linfocitos, células mononucleares y granulocitos.

## HISTOGRAMAS ESCALAS NORMALES



## INTERPRETACION DE LOS HISTOGRAMAS DE ERITROCITOS Y ADE.

La aperturas de eritrocitos cuentan partículas mayores de 36 fl como eritrocitos. Las partículas mayores de 3.0 fl o menos de 20 fl son contadas como plaquetas. (fl=femtolitros)

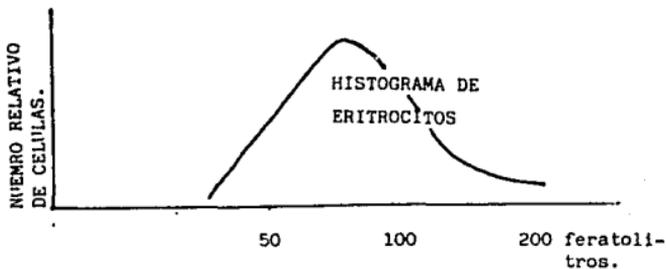


Fig. 1 C El histograma de eritrocitos, a diferencia del de leucocitos, muestra las células en su tamaño original.

El agente lítico usado en le recuento de leucocitos no es añadido al baño de eritrocitos.

El VCM es derivado del histograma de eritrocitos en los instrumentos Coulter, todas las partículas mayores de 36 fl - son contadas como eritrocitos, sin embargo el volumen celular medio es calculado del área bajo la curva del histograma de eritrocitos que tiene un límite inferior de 36 fl.

Un nuevo parámetro desarrollado por Coulter, llamado el ancho de distribución de eritrocitos (ADE) es una medida de la variación en el volumen de eritrocitos, en los instrumentos actuales el ADE es un coeficiente de variación, y es el resultado de dividir la desviación estándar de la población de eritrocitos por la media.

#### CALCULO DE ADE

ADE es el coeficiente de variación de la distribución del volumen de los eritrocitos.

$$ADE = \frac{D.E.}{MEDIA} \times 100$$

DONDE

ADE= Coeficiente de variación de la distribución del volumen de los eritrocitos.

D.E.= Desviación estándar.

ESCALA NORMAL DEL ADE 11.5-14.5%.

La media en esta fórmula es la media de la población de

eritrocitos después del ajuste del recuento de eritrocitos del área bajo la curva del histograma.

Las áreas de la izquierda y de la derecha del histograma se excluyen para evitar interferencias y errores en el conteo. Por ejemplo las plaquetas grandes interfieren a la izquierda del histograma y por lo tanto en el conteo, las aglutininas de eritrocitos u otros artefactos a la derecha del histograma.

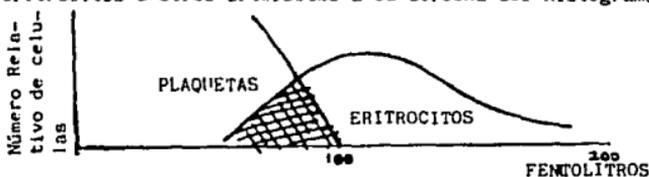


Fig. 1 e. Áreas excluidas en el conteo de eritrocitos para evitar interferencia y errores en el conteo.

Ancho de distribución del eritrocito.

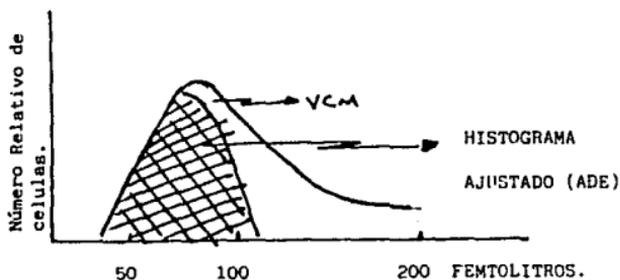


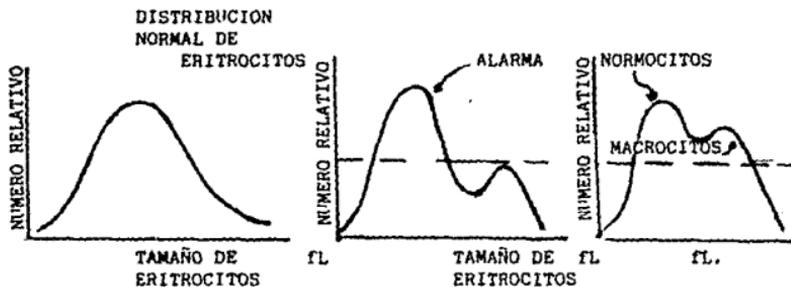
Figura 2

Es importante tener en mente que el VCM es calculado del área completa bajo la curva de eritrocitos, mientras que el ADE es calculado solamente sobre la base del histograma ajustado de eritrocitos.

El ADE es expresado numericamente como porciento del coeficiente de variación y puede ser señalado con un asterisco impreso a continuación del resultado, esto ocurre cuando la distribución de eritrocitos muestra una población doble sobre un cierto nivel de detección y se distinguen un valle entre dos picos en los datos canalizados.

#### ALARMAS DE ADE

El valor numérico de ADE puede alterarse en su valor normal (alarmarse) indicando presencia de distribución anormal de eritrocitos.



En las figuras que aparecen arriba se observa en los diagramas de la extrema derecha que existe una población doble pero el valle ocurre sobre el nivel de detección por lo tanto el ADE no será señalado.

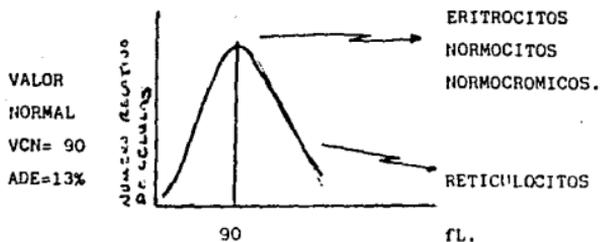
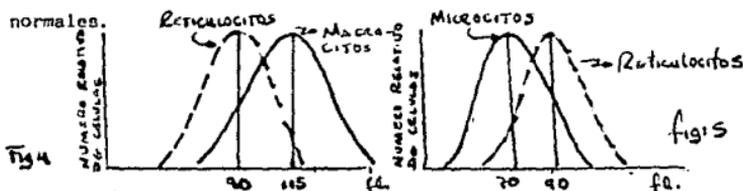


Fig.3

Los siguientes ejemplos muestran la influencia de los reticulocitos en el histograma de eritrocitos. (Fig.3).

Este sugiere que los reticulocitos<sup>1</sup> en estas situaciones van a tener volúmenes similares a las células en las cuales van a madurar y un desplazamiento de la curva hacia valores normales.



A la izquierda se muestra la curva de un paciente con una anemia macrocítica (Fig. 4) y cuyo volumen celular medio es de 115 fl clásico de la anemia megaloblástica ese paciente, tratado con B12 o folato, tendrá una respuesta reticulocítica.

A la derecha se muestra la curva de un paciente con anemia microcítica y un VCM de 74 fl lo más probable es que se trate de una deficiencia de hierro, después del tratamiento los eritrocitos tienden a un VCM de 90 fl y van a aparecer como una segunda población a la derecha de la microcítica indicado por la línea sólida (Fig.5).

1: Los reticulocitos son considerados como eritrocitos inmaduros puesto que estas células sintetizan hemoglobina en pequeña proporción ya que conservan, RNA y mitocondrias, y pueden ser distinguidas en tamaño y color.

El ADE resulta de utilidad para orientarnos entre los diversos desordenes anémicos. La distribución de células eritroides de un paciente dado, muestra un volumen corpuscular medio de 75 fl (Fig.6) pero la amplia distribución produce un aumento en la distribución estándar, lo cual conduce a un aumento en el ancho de la distribución de eritrocitos (ADE).

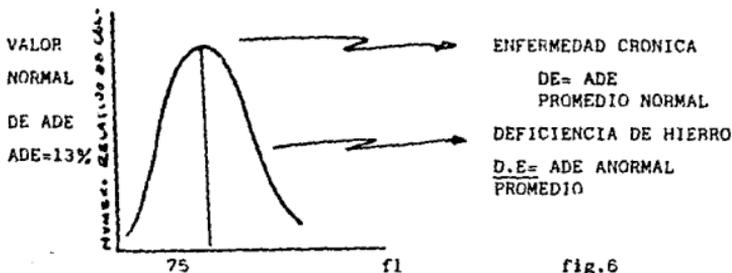


fig.6

Variación del ADE con relación a diferentes enfermedades.

El ADE de un paciente con anemia secundaria a enfermedad crónica indicado por la línea sólida permanece normal a pesar de la microcitosis, debido a que la población de eritrocitos es pequeña.

Estos enfermos tienen mucho menos anisocitosis ó variación en el tamaño de la célula, que los pacientes con anemia con deficiencia de hierro (Fig.6)

Por lo tanto, pese que el volumen de su célula media es el mismo que el de un paciente con deficiencia de hierro, la desviación estándar de la población no aumenta y el ADE permanece normal.

Uso clínico: El Dr. Bessmon ha propuesto una clasificación de los estados de anemia utilizando las mediciones de ADE y VCM

	VCM BAJO	VCM NORMAL	VCM ALTO
ADE NORMAL	Microcítica Homogénea	Normocítica Homogénea	Macroscítica Homogénea
ADE ALTO	Microcítica Heterogénea	Normocítica Heterogénea	Macroscítica Heterogénea

CUADRO 1

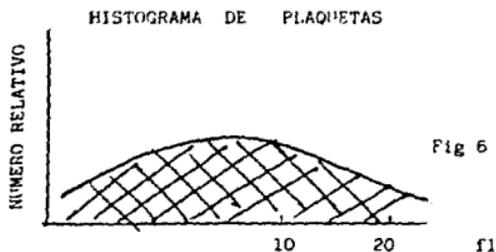
En el cuadro 1, las anemias microcíticas homogéneas estarían representadas por la talasemia heterocigótica alfa 1 y - alfa 2 y, beta talasemia menor así como la anemia de enfermedad crónica.

Aquellos con VCM normal y ADE normal incluirán a pacientes sin patología eritroide, anemia de la enfermedad crónica, hemoglobinopatías no anémicas tales como trazos de hemoglobina S - y hemoglobina C que reciben transfusiones o quimioterapia, leucemia granulocítica crónica, leucemia linfocítica crónica no complicada, hemorragia, esferocitosis hereditaria y formas anémicas de deficiencia de enzimas o anemia hemolítica autoinmune.

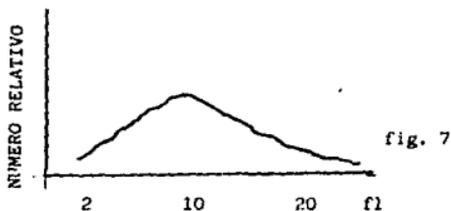
En los pacientes con VCM normales pero con ADE elevados - esperaríamos deficiencias nutricionales tempranas tales como - la deficiencia de hierro, la deficiencia de vitamina B12 o folato, las hemoglobinopatías anémicas, las mielofibrosis o las llamadas anemias por metaplasia mielóide agnógena.

Las anemias macrocíticas caracterizadas por VCM elevado y ADE normal, incluyen principalmente en anemia aplásica adquirida, algunos pacientes con enfermedad hepática no complicada y ocasionalmente pacientes con anemia perniciosa.

Las anemias macrocíticas con ADE elevados generalmente representan pacientes con diseritropoyesis u otras anemias macrocíticas complicadas tales como la deficiencia de vitamina B12 y o la deficiencia de folato, síndromes de hemoglobinas SS o aglutininas frías.



Esta distribución de logaritmo normal de plaquetas tiene un fondo sombreado que representa el histograma normal (fig.6)



El recuento y la distribución de tamaño de las plaquetas se realiza en la apertura de eritrocitos, partículas entre 2.0 y 20 fl son contadas como plaquetas.

Los datos mostrados como una línea sólida en la figura 7 son - analizados por un juego de criterios y ajustados a una distribución logarítmica normal que se extiende de 0 a 70 fl. el recuento de plaquetas se deriva de esta curva.

## DISTRIBUCION DE PLAQUETAS E INTERFERENCIA

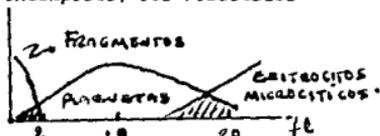
Las partículas de tamaño aproximado al de las plaquetas, pueden interferir con el recuento y el histograma de plaquetas, las partículas pequeñas, tales como las microburbujas o polvos, llegan a traslaparse en el extremo inferior, Los eritrocitos - microcíticos pueden introducirse en el extremo superior. El proceso de ajuste de la curva elimina la interferencia en los extremos superiores e inferiores mediante umbrales de manera que se pueda obtener un recuento correcto (fig. 8).

Si el recuento de las plaquetas es menor de 20 000 hay un rechazo de la curva ajustada y se codifica como error.

La codificación de error tiene lugar si el modo del histograma de plaquetas es menor de 3 fl o mayor de 15 fl si la curva es negativa o si el ancho de distribución de plaquetas es mayor de 20, la codificación de error da por resultado un error da por resultado un cálculo incompleto; los resultados no son proyectados o impresos.

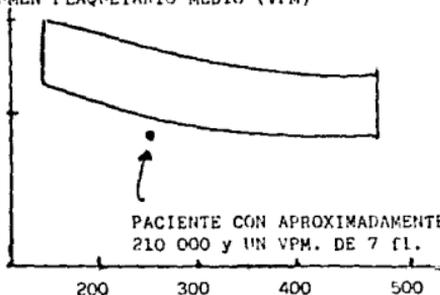
fig 8

NUMERO  
RELATIVO  
DE  
CELULAS



GRAFICA DE VOLUMEN PLAQUETARIO MEDIO (VPM)  
(BESSMAN). 10

VPM  
fl  
(Volumen  
plaquetario  
medio)



El volúmen plaquetario medio es una medida del volúmen - promedio de las plaquetas, de manera que tiene que ser considerado conjuntamente con el recuento de plaquetas.

Esto es ilustrado por la grafica elaborada por el Dr. Bessmon de la Universidad de Texas. La grafica muestra que los pacientes con un recuento bajo de plaquetas normalmente tienen un VPM más alto y los pacientes con un recuento de plaquetas más alto tienen un VPM más bajo.

El paciente indicado por el punto en la grafica anterior - tiene un recuento de plaquetas de aproximadamente 210 000 y un VPM de aproximadamente 7 fl este VPM es bajo para el recuento de plaquetas.

El Dr. Bessmon sugiere que el VPM valioso para identificar una variedad de estados clínicos.

#### SITUACIONES CLINICAS DONDE EL VPM ESTA ALTERADO

##### VPM ALTO

- Desordenes mieloproliferativos (mielofibrosis)
- Purpura trombocitopénica idiopática.
- Esplenectomía.
- Leucemia granulocitica crónica.

##### VPM BAJO

- Hiperesplenismo.
- Post-quimioterapia.
- Anemia megaloblástica.

### HISTOGRAMA DE LEUCOCITOS.

El histograma de leucocitos provee datos sobre el tamaño promedio de la célula, distribución de células: sobre el tamaño medio.

- Porcentaje de linfocitos + número absoluto
- Porcentaje de granulocitos + número absoluto

La utilidad del histograma de leucocitos es la de reconocer los elementos inmaduros, en este las células proyectadas - no son de tamaño nativo.

El agente lítico actúa sobre las membranas y citoplasma - para provocar un encogimiento de los diferentes tipos de células de manera que pueden ser identificadas tres poblaciones - que son: la que corresponde a linfocitos, una población media de células mononucleares y una tercera población, que corresponde a los granulocitos.

En el tratamiento con el agente lítico (LYSES III) todas las células rojas se estromalizan.

El citoplasma de los leucocitos no es visible ya, puesto que ha sido eliminado de la célula o se ha encogido, en lugar de ver la esperada morfología de Romanovsky para los leucocitos, se ven células pequeñas, medianas y grandes, reflejando - principalmente su tamaño nuclear.

Al lado derecho del histograma se ve el recuento de leucocitos determinado en la apertura y derivado del histograma, se obtiene el porcentaje y número absoluto de las poblaciones leucocitarias, (fig.9 .

Se observan tres poblaciones derivadas del histograma de leucocitos. En el eje x del histograma son observadas cuatro - regiones a 35, 90, 160 y 450 fl (fig.9).

Hay ciertas características esperadas de las curvas en es tas ubicaciones, debe haber un valle entre las poblaciones de linfocitos y células mononucleares, al igual debe de haber - otro valle entre la población de células mononucleares, y los granulocitos (fig.9).

El instrumento espera detectar ciertos valles de la curva en cada localidad, la computadora en el instrumento utiliza es tas ubicaciones o umbrales para determinar las tres poblaciones, usando las siguientes fórmulas:

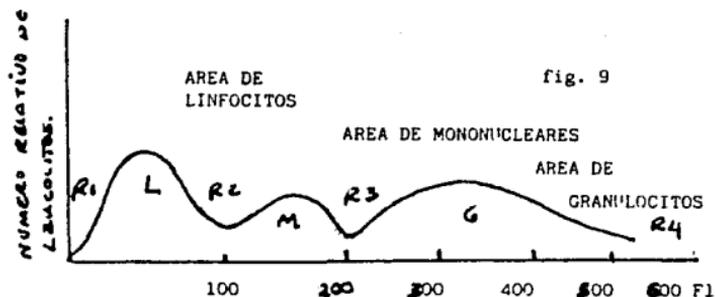
#### EQUACIONES PARA EL % DE CADA POBLACION

$$\text{Porcientos de linfocitos} = \frac{A_l}{A_l + A_M + A_g} \times 100$$

$$\text{Porcientos de Mononucleares} = \frac{A_M}{A_l + A_M + A_g} \times 100$$

$$\text{Porcientos de granulocitos} = \frac{A_g}{A_l + A_M + A_g} \times 100$$

- donde  $A_l$  = área de linfocitos.
- donde  $A_M$  = área de monocucleares.
- donde  $A_g$  = área de granulocitos.



Las ubicaciones son aproximadas, el instrumento en realidad usa umbrales flotantes, o la técnica de la "búsqueda de un valle" para determinar la posición de las poblaciones en una muestra individual, estas regiones se usan para identificar posibles anomalías de la distribución de leucocitos que normalmente ocurren a 35 fl o por encima, de manera que la región por debajo de los 35 fl debe estar limpia. Sin embargo si hay partículas presentes tales como plaquetas agrupadas o gigantes, eritrocitos nucleados, proteínas o partículas lipídicas resultantes del uso de una nutrición totalmente parenteral, entonces se obtiene interferencia en/o por debajo de los 35 fl el instrumento señalará esta condición con una R1 (fig.9). En dicha figura también se observa una región R2 que es el área que se encuentra entre las poblaciones de células mononucleares y de linfocitos que son mayores que lo normal, tales como las variantes o los linfocitos llamados reactivos de mononucleosis infecciosa, linfocitos anormales, algunos casos de casos de células inmaduras, pequeñas células plasmáticas o en algunos casos, eosinofilia o basofilia pueden producir interferencia aquí, pueden generar una señal R2 en el instrumento.

Por la situación de la región R3 que se encuentra entre las poblaciones mononucleares y de granulocitos se denota un

aumento en los granulocitos inmaduros u otras poblaciones de células anormales, elementos inmaduros de tipo mieloide y eosinofilia, pueden producir una señal R3.

Una anomalía en la región de la extrema derecha de la curva puede producir una señal R4, la causa es un recuento alto de granulocitos absolutos, si es afectada más de una de estas regiones, puede dar por resultado un señalamiento múltiple.

## FORMULA LEUCOCITARIA AUTOMATIZADA

El análisis electrónico del volumen de los leucocitos sobre el cual está basado el método para la determinación del porcentaje de linfocitos ha sido usado desde 1967 (Guathier y Van Dilla).

Este ha sido valorado como un posible auxiliar en la cuenta diferencial de leucocitos (Hughes-Jones 1974, England 1975 y 1976, Wycherley 1978, Westring 1969 y Oberjat 1970).

Sobre un control condicionado que provee el reactivo isotónico en combinación con la solución estromalizante ocurre una reacción química la cual permite distinguir entre dos distintas poblaciones de leucocitos, en base al rango de volumen de medición del medio el cual varía entre 45-99 micrometros cúbicos.

Denis B. Dorsey, propuso en 1963 que la constante relativa de los índices de las células sanguíneas podrían ser usados en el desarrollo de la instrumentación.

Estas técnicas han sido mejoradas por Brian Bull, sobre el término también llamado "Promedio de tamaño celular" usado en los paneles.

Por otra parte los sistemas de flujo permiten un análisis rápido de numerosas células, que incrementan así la exactitud del recuento y detectan componentes que figuran en pequeñas cantidades.

Para distinguir el tamaño celular se utilizan las medidas de dispersión o conductividad de la luz. Además los elementos sanguíneos se caracterizan, además midiendo la absorción lumínica, ya sea de células sin teñir o teñidas, así como la fluorencia de los componentes celulares tras la tinción con coloran-

tes fluorescentes.

En algunos sistemas pueden medir simultáneamente dos o más parámetros, como la dispersión y la absorción de la luz en una o más longitudes de onda.

La morfología celular puede observarse sin fijar, minimizando la introducción de artefactos y permitiendo la selección subsiguiente de células para su caracterización.

Usando al sistema explorador de hendidura con una banda de luz sólo unos micrómetros de anchura, es posible determinar la relación entre los diámetros nucleares y celulares para las distintas células y la interferencia por macrocitos se reduce al mínimo.

Tratando las muestras con agentes líticos los "fantasmas" celulares son eliminados del examen en un medio de suspensión de índice de refracción tal que no son detectados. Las plaquetas son suficientemente pequeñas para no interferir.

Al componente analítico del sistema hay que presentarle las células aisladas, lo cual se logra utilizando un flujo celular con una corriente de muestra estrecha (por ej. 60 micrometros) para evitar la oclusión del pequeño tubo capilar por grumos o residuos celulares. La suspensión se cubre con una capa de líquido inerte de índice de refracción idéntico al del líquido de muestra.

A partir del sistema Coulter, y ante el constante incremento y consumo de tiempo para tener un análisis de rutina de la cuenta diferencial se desarrollaron dos sistemas de análisis (1979) automatizando para el análisis de la misma.

El primer modelo reconocido, lleva a cabo la cuenta diferencial mediante el uso de un microscopio automatizado, usando un extendido teñido por la propia máquina, entonces la distribución de los diferentes subtipos de leucocitos ocurre automáticamente de acuerdo al criterio morfológico.

Entre 100 y 1000 células pueden ser contadas dependiendo del tipo de modelo usando.

Los sistemas de reconocimiento de modelos celulares emplean frotis de sangre preparados sobre portaobjetos según la técnica de la extensión o un método "hilador". La técnica hiladora produce una distribución uniforme de las células sobre el portaobjetos, mediante la fuerza centrífuga aplicada por rotación rápida del portaobjetos. Posteriormente es teñido y analizado a través de una imagen digital, utilizando un sistema de televisión microscópico intercalado con una computadora.

El portaobjetos es movido automáticamente sobre una plataforma mecánica y las células se centran en el campo de la imagen, las diferencias de color se miden por exploraciones consecutivas de la célula utilizando filtros de color, debidamente seleccionados para la tinción se valoran los hallazgos citológicos tales como tamaño celular, tamaño nuclear, forma nuclear, textura nuclear, densidad nuclear, color citoplasmático y textura citoplasmática y se establece modelos normales para células conocidas.

Las características de las células desconocidas se comparan con los modelos conocidos en la memoria de la computadora y la célula es identificada como un tipo particular cuando existe un número suficiente de características similares, con tales métodos se pueden clasificar con precisión linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos.

El segundo modelo (1979) utiliza un sistema citoquímico que ejecuta el análisis de una muestra sangre-gota (micromuestra) directamente de un modo de flujo concéntrico, la distribución de las diferentes células se utiliza para medirlas y caracterizarlas a partir de dos parámetros: actividad enzimá-

tica y volumen celular. Los dos parámetros son analizados en 3 canales (peroxidada, esterasa y azul de alcian o heparina) se analiza 10,000, células por canal ó 1000 en caso de leucopenia.

Este sistema conocido como hemalog D para la fórmula leucocitaria es un dispositivo de flujo que clasifica a las células por el tamaño y sus propiedades tintoreales, los basófilos son identificados en un canal, los monocitos en otro y una combinación de linfocitos, neutrófilos, eosinófilos como células grandes sin clasificar y células de peroxidasa elevada en un tercer canal.

Los basófilos se detectan tras la tinción con un colorante llamado azul de alcian, utilizando la técnica de pH ácido, sales de amonio cuaternaria e inones lantano, que minimiza la tinción nuclear con este colorante.

Los monocitos se identifican como grandes células que se tiñen intensamente por actividad de esterasa inespecifica mediada con un sustrato de naftilbutirato y acoplamiento del producto a naftol con fucsina básica diazada.

A la mezcla reactiva se le añaden inhibidores de la esterasa - de los neutrófilos y el plasma.

Los neutrófilos y los eosinófilos se identifican por la tinción de la peroxidasa, utilizando una mezcla de 4-cloro, 1-naftol y peróxido de hidrógeno a pH 3.2.

Las células se fijan con formaldehído antes de la tinción con el fin de asegurar la localización de la enzima.

Los eosinófilos se diferencian de los neutrófilos por su tinción de peroxidasa más intenso que el resto de las células, una pequeña proporción de neutrófilos se tiñe más intensamente que el resto (células con peroxidasa elevada) pero se diferen-

ción de los eosinófilos por la dispersión de la luz.

Los monocitos, los linfocitos "reactivos" y los granulocitos inmaduros no se tiñen con los reactivos de peroxidasa y se detectan por su aspecto de "grandes células sin teñir". Los linfocitos se identifican como pequeñas células sin teñir.

Este sistema permite la clasificación de 10,000 células - por minuto en cada canal, los resultados concuerdan con los recuentos manuales de 200 ó más células. Este sistema también ha sido usado para el análisis de variación en el recuento de los basófilos en algunas patologías, y sistemas similares han sido utilizados para el estudio de leucemia en los que la actividad de esterasa monocítica es importante.

Se han desarrollado equipos comerciales que utilizan estos principios. El LARC (Leucocyte Automatic Recognition Computer) incorpora un portaobjeto computarizado que registra las coordenadas de cada célula contada de suerte que las células no clasificadas pueden ser revisadas visualmente por el operador. La clasificación determinada por el operador es incorporada después al recuento final.

EL clasificador LARC ha sido sometido a una verificación de campo limitado y parece proporcionar resultados comparables a los procedimientos estándar, salvo que los recuentos de neutrófilos en banda son más altos que los obtenidos con métodos manuales.

No obstante el LARC y los métodos manuales son equivalentes en la detección de la "desviación a la izquierda", las células anormales son detectadas con seguridad por el sistema - automático. El analista puede explorar el portaobjetos con respecto a la morfología eritrocitaria y la estimación del recuento plaquetario.

El sistema Hematrak utiliza también un método de reconocimiento de modelo computarizado para identificar las células nucleadas en extensiones de sangre teñidas con el colorante de Wright, el morfólogo revisa la preparación respecto a su calidad y tinción, valora la morfología eritrocitaria y el recuento plaquetario, selecciona una zona de la extensión apropiada para la fórmula leucocitaria y activa el sistema electrónico. Se puede programar la máquina para que se pare ante cualquiera célula no identificada, de modo que pueda realizarse la identificación visual.

El sistema reconoce neutrófilos segmentados, en banda, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos.

En ensayos preliminares realizados en un laboratorio clínico se ha obtenido un acuerdo satisfactorio entre recuentos diferenciales manuales y los recuentos automatizados.

#### TECHNICON H 1

La tecnología innovadora del analizador hematológico TECHNICON H 1 permite evaluar el estado clínico del paciente a través de una combinación de resultados numéricos, marcadores morfológicos, citogramas e histogramas.

El sistema comprende marcadores basados en una nueva tecnología, que produce información adicional, sobre las células rojas anormales, que sirve como auxiliar para el diagnóstico y en ocasiones para el tratamiento.

Algunos sistemas antecesores de Technicon H1, el D y el 6000, utilizan el principio de la citometría de flujo; con este método, se efectúa un conteo completo de las células blancas y un conteo diferencial de las células morfológicamente no maduras, incluyendo también la morfología y conteo de

las células rojas.

En esta tecnología se involucran tres tipos de marcadores o funciones:

- reacciones citoquímicas que preparan a las células blancas - para el análisis.
- medidas citométricas específicas de las propiedades de las - células.
- conversiones por algoritmos, que transforman las medidas citométricas en resultados familiares para la clasificación y el conteo.

En el sistema estos marcadores (funciones) has sido aprovechados y se han ampliado su uso, basándose en una nueva citometría y luz experimental de barrido y se han adaptado a la - nueva tecnología computarizada y desarrollado nuevos algoritmos.

El sistema H1 consiste de cuatro canales:

- Hemoglobina
- Peroxidasa
- Células rojas y plaquetas
- Basófilos / canal nucleolobular

1.- Hemoglobina

El método usado para la medida de hemoglobina en el H 1 es una modificación del procedimiento tradicional de la cianometahemoglobina.

La superficie de las células rojas se lisa causando la liberación de la hemoglobina, la proteína desnaturizada y el grupo hemoglobina se solubiliza y se combina con cianida, la mezcla resultante se lee colorimetricamente a 546 nm.

2.- Peroxidasa.

Las células rojas se lisan y las células blancas se ti-

ñen con un cromógeno y peróxido de hidrógeno como sustrato, entonces se forma un precipitado negro con los granulos primarios que contienen peroxidasa.

La intensidad de la tinción depende de la actividad de la peroxidasa, los eosinófilos tienen una actividad más intensa - que los neutrófilos y la actividad de la peroxidasa de los monocitos es más débil.

La peroxidasa no esta presente en los linfocitos y si no se tiñen las células se les denomina células grandes no teñidas (LUCS).

Las células se mueven rápidamente y al mismo tiempo pasan a través de un par de detectores en un canal óptico.

Uno es detector de campo claro y es más sensible a los diferentes grados de absorvancia, en base a la intensidad de la tinción.

Las células son caracterizadas por una combinación de la medición del volumen y la actividad de peroxidasa.

El barrido es interpolado en el eje de la "Y" y la absorvancia en el eje de las "X".

Cada célula se representa como un punto, la posición del punto depende de la combinación de la luz de barrido y de la absorción por la célula.

Miles de células son analizadas por segundos, se usa una computadores para definir y analizar los agrupamientos, contando las células en cada agrupamiento y clasificándolas sobre la base de la información almacenada en la computadora.

Las medidas de los canales de peroxidasa son utilizadas - para la cuenta diferencial y total de las células blancas sin tomar en cuenta los basófilos. Este dato aparece en el repor-

te final.

Se usa un nuevo parámetro para medir el índice medio de peroxidasa de los neutrófilos y también como medida de la intensidad con que se tiñen.

### 3.- Canal basófilo / canal núcleo lobular.

El canal núcleo lobular se emplea para la medida de la conformación de los núcleos de las células blancas.

El método se basa en la observación de las células blancas cuando son sometidas a pH altos, en estas condiciones la membrana y el citoplasma de los neutrófilos, eosinófilos, linfocitos y monocitos se eliminan y se libera el núcleo.

Las membranas de los basófilos sin embargo permanecen intactas, lo cual nos permite su recuento por separado. El canal núcleolobular citométrico ha sido programado para distinguir los leucocitos por las diferencias en el modelo nuclear.

La citometría se basa en el laser que mide la luz de barrido en dos diferentes ángulos, uno bajo y otro alto.

El ángulo de barrido mide el volumen; como los basófilos son resistentes a la lisis y permanecen intactos, entonces su ángulo de barrido es más alto que el núcleo desnudo de los otros leucocitos, así los basófilos aparecen en lo alto del eje vertical. El umbral de fijación horizontal separa los basófilos del núcleo de otros leucocitos.

El ángulo de barrido alto es responsable de los núcleos lobulados o segmentados, estos y el ángulo de barrido se señala sobre el citoplasma.

Con la relación PNM/MN (polimorfonuclear/mononuclear) se obtiene el índice de lobularidad (LI), este nos indica el grado de segmentación de los polimorfonucleares, el valor bajo sugiere una desviación hacia la izquierda.

Los blastos aparecen a la izquierda de las células mononucleares sobre el eje de las "X" y son contadas separadamente por sus marcadores.

#### MARCADORES DE WBC

El marcador de la desviación hacia la izquierda se incrementa en una muestra con neutrófilos no segmentados.

En el citograma nuclear hay dos picos de población uno de mononucleares y otro de polimorfonucleares. Hay un valle bien definido que se presenta entre el núcleo de los polimorfonucleares y mononucleares. El marcador aparece si hay un incremento en el índice de segmentación.

El índice de segmentación es relativo a la posición donde está el pico poblacional de estos dos tipos de células nucleadas.

Esto ocurre sobre el eje de las "X" del citograma nuclear, cuando el número de neutrófilos no segmentados se incrementa, el pico poblacional se mueve hacia la izquierda y por lo tanto el índice de segmentación decrece en relación al valor normal y el valle entre las dos poblaciones se hace menos pronunciado.

La combinación de los índices de población y la presencia o ausencia de valle denota en mayor o menor grado el marcador.

#### MARCADOR DE BLASTOS

A causa de su particular estructura interna el núcleo de los blastos y otras células mononucleares anormales se ubican hacia la parte izquierda del eje de las "X" en el citograma nuclear y usualmente se agrupa con los mononucleares.

El porcentaje de células mononucleares se contabiliza como porcentaje de blastos b' y se reporta como LAB SCREEN \*.

#### MARCADO ATYP

El marcador de linfocitos "transformados" se deriva de la información obtenida de la peroxidasa y el canal nuclear lobular cuando el porcentaje de LUCs (células grandes no teñidas) se incrementa y este no puede ser contado completamente por un incremento en el "b", las células remanentes se reportan como linfocitos transformados.

#### MARCADOR IG (granulocitos inmaduros)

Los granulocitos inmaduros tal como mielocitos y metamielocitos, no se presentan normalmente en sangre periférica.

Estos pueden aparecer en desordenes mieloproliferativos y ocupan posiciones dentro del citograma peroxidasa en las regiones de la población de eosinófilos y neutrófilos.

A causa de que el índice de los granulocitos inmaduros - son no segmentados, aparece con un núcleo mononuclear en el canal nuclear así como con los polimorfonucleares.

Si la suma del por ciento de neutrófilos y el por ciento de eosinófilos del canal de peroxidasa es más grande que el por ciento de polimorfonucleares del canal de basófilos/lobulos - el marcador IG aparece.

Una variante adicional de estos sistemas es la tipificación de linfocitos.

#### METODO DE LA PEROXIDASA

La reacción de inmonofluorecencia se emplea en la subtipificación de los linfocitos.

En este método la sangre total reacciona primero con un anticuerpo monoclonal específico el cual se une a los recep-

tores de superficie de cada célula, un segundo anticuerpo marcado con biotina interactúa con el anticuerpo monoclonal se adiciona en seguida un reactivo de avidin-peroxidasa y se tiñe por un metodo similar al del canal de la peroxidasa.

Los linfocitos que han sido marcados por la reacción de - inmunoperoxidasa aparecen entre la población marcada de linfocitos y monocitos; las células con peroxidasa endógena por ejemplo, neutrófilos, eosinófilos y monocitos se tiñen intensamente y aparecen a la derecha del citograma.

#### MARCADORES MORFOLOGICOS

El H 1 tiene un sistema de marcadores para la morfología - anormal, con los cuales alerta al operador para una revisión - adicional.

Tal como el examen microscópico de la sangre, algunos marcadores son graduados en cruces (desde una cruz hasta cuatro cruces) que son generados por una serie de pulsos.

La forma de reportar los marcadores morfológicos se dan en tres columnas:

1a columna: PARAMETER se enlistan los marcadores.

2a columna: SUSPECT se registra los pulsos o una carta para - identificar las anomalías.

3a columna: VERIFY: un espacio sobre comentarios después de la revisión visual del frotis sanguíneo y otra verificación de los marcadores

#### MARCADORES

HBC; Hay seis marcadores morfológicos para los eritrocitos, los cuales indican el grado de severidad, hay uno relacionado con el Volumen: anisocitosis (ANISO), microcitosis (MICRO). y macrocitosis (MACRO).

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Hay otro relacionado con la concentración de la hemoglobina corpuscular o color (hemoglobinización) anisocromía (VAR) hipocromía (HYPO) hiperocromía (HYPER).

El marcador de RBC se da en cuatro dígitos.

El primer dígito corresponde a la distribución del RBW (distribución de glóbulos rojos)

el segundo da el volumen (macro o micro)

el tercero HDW concentración de hemoglobina y

el cuarto el color (hipo o hiper).

#### MARCADORES DEL VOLUMEN

El rango normal para el volumen celular individual de los eritrocitos es entre 60-120 fl como indicadores de los límites - marcados en el histograma de volumen RBC el cual demuestra la distribución del volumen celular por célula.

#### MARCADORES DE COLOR (RBC)

El histograma de concentración de hemoglobina representa la distribución de hemoglobina celular individual de la población sanguínea. los límites normales se consideran entre los rangos de 28 g/L 41 g/L

El marcador VAR se basa en la distribución de hemoglobina este se desvía de su valor si los valores son más altos que - los normales.

El marcador de color de células con una concentración de hemoglobina menor de 28 g/dl se considera como hipocromía y - cerca de 41 g/dl como hiperocromía.

El por ciento de células normocromicas, hipocromicas e - hiperocromicas se distribuyen entre estas categorias.

## RESUMEN

Comparando las ventajas y desventajas de los métodos automatizados con respecto a los métodos manuales, en el aspecto tecnológico se observa una marcada tendencia de uso en el trabajo de rutina hacia los métodos automatizados, ya que nos proporciona una gran gama y versatilidad de parámetros de una muestra analizada.

Esto proporciona un panorama de apoyo en la evaluación del estado clínico del paciente y a la vez resulta de gran utilidad en ciertas ocasiones como factor determinante en el diagnóstico, terapia, tratamiento, seguimiento y pronóstico del paciente.

El costo del equipo se considera como una limitante ya que en muchos laboratorios no se cuenta con posibilidades económicas para adquirir un equipo como este.

Otra limitación es el manejo y mantenimiento ya que este equipo es muy sensible y delicado.

Constituye un problema la interpretación de las discrepancias entre los datos aportados por el sistema automático y los datos aportados por los métodos tradicionales de recuento diferencial.

Aún el problema es el costo del equipo, ya que su cuidado, mantenimiento y manejo deben ser minuciosos, no obstante hay una tendencia en disminuir los costos generales de las pruebas de laboratorio además los análisis así obtenidos demuestren una disminución de los errores técnicos accidentales, aumentando así la calidad de los resultados, comparando con los métodos manuales de recuento celular que resultan en ocasiones engorrosos y pesados e implica un menor grado de precisión.

Dentro de las ventajas que ofrecen las técnicas automatizadas en la rutina del laboratorio de hematología se citan las siguientes:

-Menor incidencia de errores en el recuento de eritrocitos, plaquetas y leucocitos.

-Eliminación del error que introduce el plasma en la lectura del hematócrito (hematócrito electrónico).

-Se tiene un mejor control de calidad del trabajo, de forma estadística, ya que estos aparatos trabajan con histogramas, en base a la desviación estándar y dispersión de los datos.

-Se pueden procesar grandes volúmenes de trabajo en la rutina ya que el tiempo que se requiere para el recuento celular y reporte de los resultados es muy corto.

-El volumen ocupado de muestra del paciente es despreciable con respecto al utilizado en los métodos manuales.

-La introducción de los histogramas, citogramas y algoritmos para transformar los datos en resultados familiares nos da una gran ventaja al interpretar los resultados para así obtener un diagnóstico presuntivo de las posibles alteraciones en los elementos sanguíneos ya que proporcionan un gran número de rasgos a evaluar.

-Con la introducción de marcadores se elimina la evaluación subjetiva de las alteraciones en el volumen, color y forma de las células.

-Introducción y uso de técnicas inmunoenzimáticas para la clasificación, identificación de los diferentes estados de maduración y de los elementos de la serie blanca (neutrófilos, eosinófilos, basófilos y linfocitos) esto da la ventaja de una buena cuenta diferencial, ya que ofrece reacciones bioquímicas específicas sobre los diferentes constituyentes bioquímicos de las células blancas.

## DESVENTAJAS Y LIMITACIONES

### LIMITACIONES

Los resultados obtenidos por los métodos anteriormente descritos son similares o mejores que los obtenidos por los métodos manuales.

Sin embargo el equipo de canales múltiples es no obstante, mecánica y electrónicamente bastante complejo y se requiere un nivel de guía y vigilancia, en cuanto a la mala función que ha menudo ha confundido al personal operativo en laboratorios hematológicos.

Se utilizan para su estandarización normalmente preparaciones de sangre estabilizada, suspensiones de partículas o muestras de sangre fresca, analizadas por procedimientos manuales. Ninguna de estas preparaciones ha sido superada completamente de modo satisfactorio.

Con el contador Coulter Counter aparecen errores en la medición del volumen corpuscular medio, y como consecuencia en el valor de hematócrito, cuando el recuento de leucocitos es muy elevado. Frecuentemente este recuento es falsamente bajo cuando hay una linfocitosis acentuada, como se observa en la leucemia linfocítica crónica debido a la fragilidad de los leucocitos leucémicos.

Tampoco resulta muy correcta la correlación entre la conductividad de la sangre y el valor de hematócrito, más importantes son las alteraciones de conductividad que ocurren cuando hay una elevación manifiesta de las proteínas séricas.

-El recuento eritrocitario se ve afectado por eritrocitos resistentes a la lisis, o eritrocitos nucleados, fragmentos de leucocitos y partículas más grandes que 45.3 fl.

-Otro parámetro que se ve dañado es el volumen (VCM) cuando -

existe leucocitosis, trombocitosis o aglutininas frías.

-La hemoglobina también se ve aparentemente afectada cuando hay leucocitosis, con una lipemia severa, heparina y la presencia de eritrocitos anormales resistentes a la lisis.

Al verse alterado este parámetro se verán afectados algunos de los índices hematológicos.

Tales interferencias se deben tener en cuenta para dar resultados confiables.

- Los leucocitos normalmente ocurren a 35 fl o por encima de esta región de manera que la zona cercana o en los 35 fl deben estar libre de artefactos o partículas que puedan interferir en el conteo de leucocitos, tales como plaquetas agrupadas o gigantes, eritrocitos nucleados, eritrocitos no estromalizados, proteínas o partículas lipídicas resultantes de una alimentación parenteral entonces se puede tener interferencia en el conteo.

-Las partículas de aproximadamente el tamaño de las plaquetas pueden interferir con el conteo y el histograma de plaquetas, las partículas pequeñas tales como microburbujas o polvo, se pueden sobreponer con el extremo inferior, los eritrocitos microcíticos pueden traslaparse en el extremo superior.

Los equipos automatizados en hematología como en cualquier otra área de laboratorio clínico, resulta de gran utilidad para aligerar la carga de trabajo, sin embargo se deben tener presente las limitaciones de la automatización pues siempre existiran patologías que requieren ser analizadas individualmente, estos equipos, permiten que el morfológo pueda desarrollar aun más su potencial pues se enfocará aquellos problemas no resueltos por la automatización.

## BIBLIOGRAFIA

- ROBERT PIERRE, M.D. -"SEMINARIOS Y ESTUDIOS DE CASOS" .  
El diferencial automatizado. Fundación Mayo,  
Rochester, MN, Abril 1987.
- E. NEUMANN. -"CRITICAL REMARKS ON AUTOMATED SYSTEMS FOR  
LEUCOCYTE DIFFERENTIATION FROM THE POINT OF  
VIEW OF A CLINICAL HEMATOLOGIST" Editorial  
Technicon.
- ELKIN SIMSON, "TECHNICON H 1 SYSTEM, TECHNOLOGY DESCRIPTION" M.B.M. Med. (Phat)  
Long island medical center NEW YORK 1982.
- A QUANTITATIVE, AUTOMATED HEMATOLOGY ANALYZER INTENDED  
TO REPLACE CONVENTIONAL LABORATORY METHODS FOR  
DETERMINING HEMATOLOGY PARAMETER.
- MANUAL DE OPERACION COULTER COUNTER. Model S-Plus III  
(junio 1982).
- RAUL NIETO. "MANUAL DE HEMATOLOGIA" 1989. FACULTAD DE QUIMICA
- QFB GUILLERMO GONZALEZ. "MANUAL DE HEMATOLOGIA", 1984.  
Facultad de Química.
- WILLIAM J. WILLIAM Y ARTHUR S. SCHNEIDER. "HEMATOLOGIA  
Edit. Salvat 1983, 2a Edición tomo I pag. 11-  
-25
- WINTROBE. "HEMATOLOGIA". CLINICAL HEMATOLOGY.  
Seventh Edition 1974 Edic. Lea and Febiger  
Philadelphia.