

00544



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION
" SALVADOR ZUBIRAN "

IDENTIFICACION DE BLASTOS EN SANGRE PERIFERICA POR EL AUTOANALIZADOR EN HEMATOLOGIA COULTER GEN-S

TESIS DE POSGRADO
QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALIZACION EN BIOQUIMICA CLINICA AREA DE HEMATOLOGIA PRESENTA:
Q.F.B. JULIO CESAR MARTINEZ ALVAREZ

ASESOR: Q.F.B. JOSEFA PIEDRAS ROSS
DEPARTAMENTO DE HEMATOLOGIA Y ONCOLOGIA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION "SALVADOR ZUBIRAN"

295252

MEXICO, D.F.

NOVIEMBRE DE 2001





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



ERIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE QUÍMICA
DIRECCIÓN

BIOL. FRANCISCO J. INCERA UGALDE.
Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado.
Presente.

Me es grato informarle que el alumno **JULIO CESAR MARTINEZ ALVAREZ** presentará próximamente su examen para obtener el diploma de Especialización en Bioquímica Clínica (Clave 341) ante el siguiente jurado:

Presidente:	Dr. Xavier López Karpovich (INN)
Primer Vocal	Q.F.B. Romelia Velasco Ortiz (INP)
Secretario:	Dra. Rebecca Franco Bourland (INN)
Primer Suplente:	Dra. Patricia Elena Baz Gutiérrez (I.N.Cancerología)
Segundo Suplente:	Q.F.B. Esp. B.C. Lina Teresa Romero Guzmán (INP)

Sin otro particular de momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D. F., 26 de octubre de 2000.

El Director

Dr. Enrique R. Ruzúa Rueda

Recibi: 13/11/00

- C.c.p. Integrantes del Jurado
- C.c.p. Coordinador de Área
- C.c.p. Departamento de Control Escolar
- C.c.p. Interesado
- *ggm.

Recibi 10/11/2000

Recibi 13, Nov 2000
Lina T. Romero

Recibi 16/11/00

Recibi 8 Nov 2000
Rebecca

Agradecimientos

A la Q.F.B. Josefa Piedras Ross, por su asesoramiento, por compartir sus conocimientos y su vasta experiencia para la realización de esta tesis y por su enorme paciencia.

A la Dra. Rebecca Franco por su apoyo.

A toda mi familia y en especial a mis padres, por creer en mi

A mis amigas y maestras: Isabel Galván, Reyna Saldaña e Isabel Gámez, por su infinita paciencia y valiosa amistad.

A mi muy querida amiga: Griselda Noguez, por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas.

Al Dr. Vicencio Juárez Barreto, por su apoyo y amistad.

A mi gran amiga Sonia Luna por su valiosa amistad.

A mis amigos del Instituto Nacional de Cancerología, por su apoyo y amistad.

A mis compañeros de la especialidad, por compartir gratos momentos conmigo.

A mi amiga Lupita Jiménez por su apoyo y amistad.

A la Maestra Dolores Lastra y Norma por su apoyo y paciencia.

A todos los pacientes del Departamento de Hematología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", ya que sin ellos no hubiese sido posible la realización de esta tesis.

Y a todas aquellas personas que de una forma u otra contribuyeron a la realización de esta tesis.

Contenido

	Página
Resumen	2
Introducción	4
Generalidades	7
Índices de la eficiencia diagnóstica de una prueba	23
Objetivos	25
Material y métodos	26
Resultados	28
Discusión	33
Conclusiones	38
Referencias	39

Resumen

Las leucemias son un grupo de enfermedades malignas de la sangre muy relacionadas entre sí caracterizadas por la producción de células inmaduras de la sangre. Es muy importante que las muestras de sangre periférica con sospecha, o posible leucemia aguda, sean evaluadas en busca de células leucémicas, por lo tanto, la detección de blastos por un autoanalizador en hematología adquiere especial relevancia. Varios estudios han demostrado que los autoanalizadores son diagnósticamente útiles en la identificación de blastos. Del 1 de febrero al 31 de mayo de 2000 se recabó la información de todas las muestras de sangre que llegaron al Departamento de Hematología para la realización de una cuenta diferencial de leucocitos por método visual. El estudio se realizó en 371 pacientes, con diagnósticos diversos para evaluar la utilidad diagnóstica del autoanalizador en hematología Coulter Gen - S en la identificación, mediante "banderas de blastos" en sangre periférica, tomando como "estándar de oro" la observación de estas células anormales en el frotis. Se obtuvieron valores de sensibilidad de 77 %, especificidad de 85 %, valor predictivo positivo de 46.1 % y valor predictivo negativo de 95.7 %. Con base a estos datos concluimos que el valor predictivo negativo de 95.7 % permite afirmar que en presencia de una muestra que no presente "banderas de blastos" es poco probable que estas células leucémicas se identifiquen en el examen microscópico del frotis y que con los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos, es necesario que todas las muestras con

“banderas de blastos”, o aquellas que provengan de pacientes con sospecha clínica de leucemia aguda se realice el examen microscópico del frotis teñido con Wright en busca de células leucémicas.

Introducción:

La leucemia aguda es una enfermedad clonal maligna del tejido hematopoyético que se caracteriza por la proliferación anormal (leucémica) de blastos, principalmente en la médula ósea, y por la producción alterada de glóbulos rojos normales. Por lo tanto, la infiltración de la médula ósea por células leucémicas se acompaña casi invariablemente de anemia, trombocitopenia y leucopenia o alguna combinación de éstas citopenias. Las leucemias agudas son un grupo heterogéneo de neoplasias que afectan a la célula hematopoyética pluripotencial no comprometida o parcialmente comprometida. Las leucemias agudas se dividen en mieloides y linfoides basado en la célula de origen. Ambas difieren una de la otra en la presentación clínica, el curso y la respuesta al tratamiento.

El desarrollo de los métodos automatizados para la obtención de la cuenta diferencial de leucocitos ha permitido abatir costos y tiempos en los análisis de rutina. Sin embargo, esta tecnología es incapaz de identificar y clasificar todas las anormalidades o células inmaduras. Por consiguiente, la mayoría de los equipos identifica poblaciones de células blancas anormales por señalización con "banderas" (alarmas), indicando la necesidad de revisar la morfología por método visual. Los equipos automatizados utilizados para obtener la cuenta diferencial de los leucocitos son, en términos generales de dos tipos: los que identifican células en base a un patrón de reconocimiento, por tinción y por microscopía automática;

y los que utilizan un sistema de flujo para identificar las células en base a su tamaño y a sus características morfológicas.

Es muy importante que las muestras con sospecha, o posible leucemia aguda, sean evaluadas en busca de células leucémicas, por lo tanto, la detección de blastos por un analizador en hematología adquiere especial relevancia. Varios estudios han demostrado que los autoanalizadores son diagnósticamente útiles en la identificación de blastos. Sin embargo, como sucede frecuentemente en la evaluación de una prueba o procedimiento nuevos de laboratorio, la población de pacientes elegida para examinar la sensibilidad y especificidad se restringe principalmente a la condición o padecimiento que se desea evaluar. Este procedimiento puede dar resultados artificialmente favorables, y cuando la prueba se aplica a un espectro amplio de condiciones, clínica y biológicamente relacionadas, puede ser menos específica¹.

Hoyer y cols.² para evaluar específicamente la capacidad del Coulter STKS para detectar la presencia de blastos en leucemia aguda, así como la capacidad del instrumento para ayudar a distinguir la leucemia aguda linfoide de la leucemia aguda mieloide, incluyeron exclusivamente 110 casos de leucemia aguda. D'Onofrio y cols.³ que también evaluaron la sensibilidad y especificidad de un autoanalizador en hematología (Technicon H*1) sólo incluyeron en su material humano, pacientes con leucemia aguda en diferentes etapas de la enfermedad.

Tomando en consideración estos antecedentes, en el presente estudio, para establecer la sensibilidad y especificidad en la identificación de blastos del

autoanalizador Coulter Gen-S, se incluyeron, además de pacientes con leucemia aguda, a pacientes con una amplia gama de padecimientos hematológicos y no hematológicos.

Generalidades

La leucemia aguda (LA) es un grupo heterogéneo de padecimientos caracterizados por la proliferación desordenada de una clona de células hematopoyéticas. La alteración de los mecanismos de control negativo del crecimiento clonal mutante casi siempre se deben a cambios en los genes reguladores, lo que conduce a una sobre producción sin sentido de células incapaces de madurar y funcionar normalmente. Las células malignas maduran con lentitud y de manera incompleta; el tiempo de su ciclo celular a menudo es prolongado y la mayoría de dichas células incompetentes sobreviven más que las normales, sin cumplir con su función ordinaria.

La palabra leucemia significa "sangre blanca" y el término "aguda" se conserva en la actualidad por razones históricas. Un término más adecuado que el de leucemia "aguda" sería el de leucemia de "blastos", dado que en estos trastornos el tipo predominante de célula maligna proliferante es una célula inmadura poco diferenciada conocida como "blasto". La proliferación descontrolada de estas células en la médula ósea, el desplazamiento de los precursores medulares normales y la invasión del resto de los órganos de la economía son los principales mecanismos responsables de los efectos devastadores de la enfermedad.

La causa precisa de la LA se desconoce. La proliferación clonal por medio de divisiones sucesivas a partir de una célula progenitora constituye el origen de la

leucemia aguda tanto linfoblástica como mieloblástica. Es posible que la exposición a derivados del benceno desempeñe algún papel en la aparición de la leucemia, así como la exposición a radiaciones ionizantes. Los agentes que dañan el ADN, como los alquilantes, pueden causar leucemia; las leucemias agudas secundarias al uso de sustancias quimioterapéuticas para otras enfermedades son muy agresivas. Algunos virus pueden generar leucemias; entre ellos es posible mencionar a los retrovirus como el virus linfotrópico de células T humanas tipo I y II, que tienen semejanzas con el virus de la inmunodeficiencia humana 1, agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Los padecimientos en los que hay inestabilidad cromosómica, como el síndrome de Fanconi, pueden culminar en leucemia aguda, y la prevalencia de este tipo de leucemia es mayor en individuos con trisomía del cromosoma 21 (síndrome de Down) que en la población general^{4,5}.

Tipos de Leucemia aguda

- a) mieloide, cuando afecta la producción de monocitos o granulocitos. (LAM)

- b) linfoide, cuando afecta la producción de linfocitos. (LAL)

Clasificación morfológica

En 1976, fueron propuestos por un grupo internacional de investigadores franceses, americanos y británicos (FAB) los criterios para realizar la clasificación morfológica de la leucemia aguda, que las dividía en nueve tipos, tres de estirpe linfoide y seis de estirpe mieloide. El desarrollo de esta clasificación FAB fue estimulado por la necesidad de un esquema que unificara los criterios morfológicos y sirviera para correlacionarlos con el pronóstico de la enfermedad. Algunos años más tarde y ante el cúmulo de información generada por el uso de inmunorreactivos para estudiar y clasificar a las células leucémicas, los mismos miembros del grupo FAB agregaron a esta clasificación inicial dos variedades más de LAM (M0 y M7), las que estrictamente no pueden ser diagnosticadas sólo con bases puramente morfológicas, ya que requieren estudios adicionales para ser definidas (Cuadro 1) ^{6,7}.

Cuadro 1. Clasificación FAB de la Leucemia Aguda Linfoblástica (LAL)

Hallazgos citológicos	L1	L2	L3
Tamaño celular	Predominan células pequeñas	Grande, tamaño heterogéneo	Grande y homogéneo
Cantidad de citoplasma	Escaso	Variable	Moderadamente abundante
Nucleolos	No visibles	Uno o más grandes	Uno o más, frecuentemente prominentes
Cromatina nuclear	Homogénea	Variable	Finamente punteada y homogénea
Basofilia citoplasmática	Variable	Variable	Intensa
Vacuolas citoplasmática	Variable	Variable	Prominente

Además de las características morfológicas descritas en el cuadro 1, debe señalarse que los linfoblastos leucémicos (a diferencia de los mieloblastos) no contienen gránulos peroxidasa positivos sino que contienen grandes agregados de material PAS-positivo (ácido periódico-Schiff). La tinción para la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), una polimerasa de ADN, es también útil para diferenciar la LAL de la LAM, debido a que está presente en el 95% de los casos de LAL, pero sólo en el 5% de los casos de LAM. Las LAL TdT negativas tienen típicamente la morfología L3.

La LAM tiene orígenes diversos. Algunas surgen por la transformación de células madre mieloides pluripotenciales (trilíneas), lo que se pone de manifiesto

por alteraciones citogenéticas comunes en los precursores granulocíticos y eritroides, incluso aunque la sangre periférica y la médula ósea estén dominadas por mieloblastos. En otras está afectado el precursor común de granulocitos y monocitos, lo que da lugar a la enfermedad mielomonocítica. En la clasificación FAB revisada (cuadro 2), la LAM se divide en ocho tipos. Este esquema toma en consideración tanto el grado de maduración (M0 a M3) como la estirpe predominante de diferenciación de las células madre leucémicas (M4 a M7)^{7,8}.

Cuadro 2. Clasificación FAB de la Leucemia Aguda Mieloide (LAM).

Clase	Morfología medular/Comentarios
M0 LAM mínimamente diferenciada	Los blastos carecen de marcadores citológicos y citoquímicos, expresan antígenos de estirpe mieloide
M1 LAM sin diferenciación	Muy inmaduros pero $\geq 3\%$ peroxidasa positivos; pocos cuerpos de Auer
M2 LAM con maduración	La mayoría con cuerpos de Auer, maduración mieloide hasta los granulocitos
M3 Leucemia aguda promielocítica	La mayoría de las células son promielocitos hipergranulares con cuerpos de Auer
M4 Leucemia aguda mielomonocítica	Es evidente la diferenciación mielocítica y monocítica
M5 Leucemia aguda monocítica	Predominan los monoblastos y los promonocitos
M6 Eritroleucemia aguda	Predominan eritroblastos anormales (algunos megaloblastoides, otros con núcleos gigantes o múltiples), existen algunos mieloblastos
M7 Leucemia aguda megacariocítica	Predominan blastos de estirpe megacariocítica; reaccionan con anticuerpos específicos de plaquetas dirigidos contra GPIIb/IIIa o FvW

Importancia de los blastos en la clasificación de las leucemias

Los morfológicos experimentados pueden clasificar hasta el 70 % de las leucemias agudas como LAL o LAM por la apariencia de los blastos con la tinción de Romanovsky, basado en las características del núcleo y del citoplasma. La característica morfológica más importante en la identificación de blastos es el patrón de la cromatina del núcleo. La cromatina en el linfoblasto es más compacta y de distribución irregular. Hay presencia de varios nucleolos. El nucleolo puede ser indetectable o aparecer prominente por la condensación de la cromatina alrededor de la membrana del núcleo o del nucleolo. En los blastos de la LAM la cromatina es fina, punteada y uniformemente distribuida. Los nucleolos son únicos o múltiples y son usualmente prominentes, las membranas del núcleo y del nucleolo son indistinguibles. Los nucleolos de los linfoblastos son plegados o enrollados y el citoplasma es escaso y sin gránulos. Los mieloblastos tienen citoplasma más abundante que puede contener gránulos finos. Los gránulos de la leucemia aguda promielocítica son anormalmente grandes y prominentes excepto en la variante microgranular. Los cuerpos de Auer que semejan agujas, son inclusiones citoplasmáticas de los blastos. Los cuerpos de Auer son condensaciones de gránulos azurófilos y su presencia es diagnóstica de linaje no linfoide. Los cuerpos de Auer pueden ser múltiples o únicos y se ven en aproximadamente 60 a 70 % de los casos de LAM⁹.

Equipos automatizados para hematología

Los métodos automatizados para la cuenta de células sanguíneas emplean varios tipos de tecnologías, cada una con características únicas. Se encuentran disponibles dos tipos de contadores automatizados: aquellos que dependen de cambios en impedancia en el flujo eléctrico y aquellos que usan diferencias en las propiedades de dispersión de la luz. La mayoría de los analizadores automatizados también realizan otras mediciones, tales como concentración de hemoglobina, tamaño de los glóbulos rojos y cuenta diferencial de leucocitos. Los instrumentos más nuevos pueden realizar también pruebas más especializadas como cuenta de reticulocitos¹⁰.

En 1956, Coulter patentó un equipo que contaba automáticamente eritrocitos y leucocitos, utilizando un método de apertura-impedancia. El diseño de ese equipo está basado en el muy conocido principio de Coulter: una suspensión de células sanguíneas es pasada a través de un pequeño orificio simultáneamente con una corriente eléctrica. Al pasar una a una las células a través del orificio o apertura, provocan un cambio en la impedancia debido al tamaño de la célula. El sistema realiza una cuenta de manera individual de las células y proporciona una distribución del tamaño celular. Ya que las células sanguíneas actúan como un aislador, al pasar a través de la apertura y al estar suspendidas en un diluyente de conductividad continua, se crea un impulso y se incrementa la impedancia momentáneamente, y el número de impulsos puede ser registrado para indicar la

cuenta celular directamente. Coulter sugirió que el tamaño de las células también podía ser determinado por este método, basado en que la amplitud de los impulsos era proporcional al volumen celular. Los equipos que usan tecnología impedancia-apertura, requieren suspensiones celulares para que las células pasen individualmente a través de la corriente eléctrica. La distorsión de los pulsos eléctricos puede ocurrir cuando las células no pasan a través del centro de la apertura, o cuando más de una célula entra a la apertura al mismo tiempo.

Este principio se ha empleado durante muchos años; y los mayores avances se han dado en la capacidad de instrumentos multicanal, y en el desarrollo de los sistemas electrónicos, particularmente con el advenimiento de los microprocesadores.

El Technicon hemalog D, H-6000, y H-1 determinan los tipos de leucocitos basados en el tamaño de la célula y en las características de tinción citoquímica. El autoanalizador en hematología Sysmex NE-8000 combina el desarrollo de la diferencial de leucocitos de cinco parámetros con parámetros de eritrocitos y plaquetas. Su técnica analítica se basa en el principio de detección por resistencia eléctrica. El instrumento utiliza un sistema de apertura hidrodinámico y posee cinco detectores separados para la detección de leucocitos (linfocitos, monocitos y granulocitos), eritrocitos/plaquetas, eosinófilos, basófilos y hemoglobina. El autoanalizador en hematología Sequoia-Turner Cell-Dyn 3000 basa su principio utilizando luz polarizada desviada en varios ángulos y cada célula es caracterizada de forma individual de acuerdo al ángulo específico de luz desviada¹⁰. El Abbott

Cell-Dyn 4000 incorpora cuatro diferentes tecnologías de medición, incluyendo citometría de flujo fluorescente, y el uso de fuente de luz láser-argón para el análisis de reticulocitos y eritroblastos en particular¹¹.

Los contadores tipo Coulter son probablemente los analizadores hematológicos más ampliamente utilizados. La mayoría de los métodos imprimen los datos en forma numérica, así como también proporcionan histogramas del tamaño de los elementos sanguíneos. Los modelos actuales además de la cuenta de eritrocitos, leucocitos y plaquetas, incluyen la cuenta diferencial de los leucocitos. Este tipo de instrumentos analizan completamente hasta 109 muestras por hora, dependiendo del modelo empleado, y de las "banderas" de poblaciones anormales de eritrocitos y leucocitos, incluyendo blastos y células atípicas.

El método de dispersión de la luz para la determinación del tamaño celular, depende de los siguientes principios. Al chocar una partícula o célula sanguínea con un rayo de luz visible o rayo láser, esta luz es desviada en un ángulo (Figura 1), el cual está en función de las propiedades de esa partícula o célula. El ángulo de desviación depende de la suma de las propiedades de la célula, incluyendo volumen, forma, e índice de refracción, el tamaño de la célula es de gran importancia. El programa de computación se encarga de acumular, evaluar y reportar esos datos, tanto el tamaño como el número de células.

Una gran cantidad de instrumentos utilizan el sistema de iluminación con rayo láser, el que puede ser más finamente enfocado, permitiendo con ello una mayor profundidad focal. Los rayos monocromáticos de luz láser producen patrones de

dispersión que parecen ser más útiles en la caracterización de la estructura de varias células sanguíneas con evidente utilidad diagnóstica ^{10,12}.

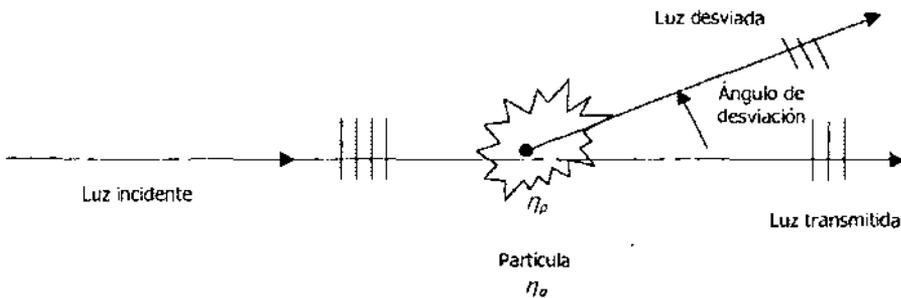


Figura 1. Representación esquemática de la desviación de la luz al choque con una partícula. Donde: n_p y n_o son índices de refracción.

Seguido de la cuenta de leucocitos, estas células se analizan para determinar el porcentaje de cada tipo celular de leucocitos haciendo lo que se conoce como "cuenta diferencial de leucocitos". Los métodos automatizados para obtener cuenta diferencial de leucocitos son incapaces de identificar y clasificar todas las células anormales o inmaduras. Así, la mayoría de estos instrumentos identifican a la población anormal de leucocitos mediante "banderas", indicando la necesidad de examinar el frotis por un morfológico ¹⁰.

Los instrumentos automatizados utilizados para realizar diferenciales de leucocitos son de dos tipos: aquellos que usan frotis teñidos y microscopios automatizados para la identificación de las células sobre la base de patrones de reconocimiento, y los que emplean un sistema, que a través de un flujo, identifica a las células en base a su tamaño y características de tinción. Los sistemas de patrones de reconocimiento estuvieron disponibles desde la década de los 70. Esta tecnología empleaba un frotis de sangre en un cubreobjetos que se teñía y cargaba en la máquina. Una computadora manejaba un microscopio mecánico, hasta que se identificaba un área teñida de oscuro correspondiente al núcleo del leucocito. Usando datos colectados para cada célula sobre tamaño celular, coloración del núcleo y del citoplasma y densidad, la computadora apareaba los patrones de datos con especificaciones para cada tipo de leucocito e identificaba la célula ¹⁰.

Autoanalizador en hematología Coulter Gen-S

El Coulter Gen-S es un autoanalizador en hematología, en el que la realización de la cuenta diferencial de leucocitos se lleva a cabo en una porción de la sangre aspirada, la que es diluida y dirigida a un flujo celular separado. Después de la lisis de los eritrocitos y de la estabilización del tamaño de los leucocitos, una vaina de flujo enfoca hidrodinámicamente a los leucocitos a través del flujo celular. El principio fundamental del equipo es conocido como VCS (del inglés: volume,

conductivity and scatter light. Volumen, conductividad y dispersión de la luz láser). El análisis volumétrico se deriva de la impedancia de una corriente de baja frecuencia. El análisis estructural relacionado a la conductividad celular por aplicación de una corriente de alta frecuencia (22 kHz), también proporciona información en relación al contenido intracelular. El análisis de la dispersión de la luz con un rayo láser rojo de helio neón (longitud de onda de emisión a 633 nm) evalúa la superficie y la estructura interna de las células y proporciona detalles suplementarios acerca del tamaño, forma y reflectividad. Las poblaciones celulares son separadas por grupos de análisis tridimensional de estos parámetros. Para la mayoría de las muestras se analizan aproximadamente 8 000 células, mientras que en sangres con leucopenia se analizan un mínimo de 2 000 células. Utiliza 250 μ L de muestra en modo primario (tubo cerrado) y 150 μ L en modo secundario (tubo abierto) y procesa 100 muestras por hora. En la gráfica de puntos (Fig. 2) se muestra la localización típica de las poblaciones celulares en un plano bidimensional, generado con la medición de la dispersión de luz (eje de las abscisas) y la medición del volumen (eje de las ordenadas). Los linfocitos pequeños y los basófilos que tienen tamaño similar son separados por diferencias en la conductividad debido a la diferente composición celular. En esta proyección bidimensional los basófilos están ocultos atrás de los linfocitos. Como se muestra en la figura 2, las células anormales (linfocitos atípicos y blastos) también pueden tener localización distintiva en esta gráfica de puntos. Cuando determinados patrones en la gráfica de puntos sugieren la presencia de células anormales, el

instrumento genera algoritmos propios que aparecen en el informe como "banderas de sospecha" de glóbulos blancos ¹³.

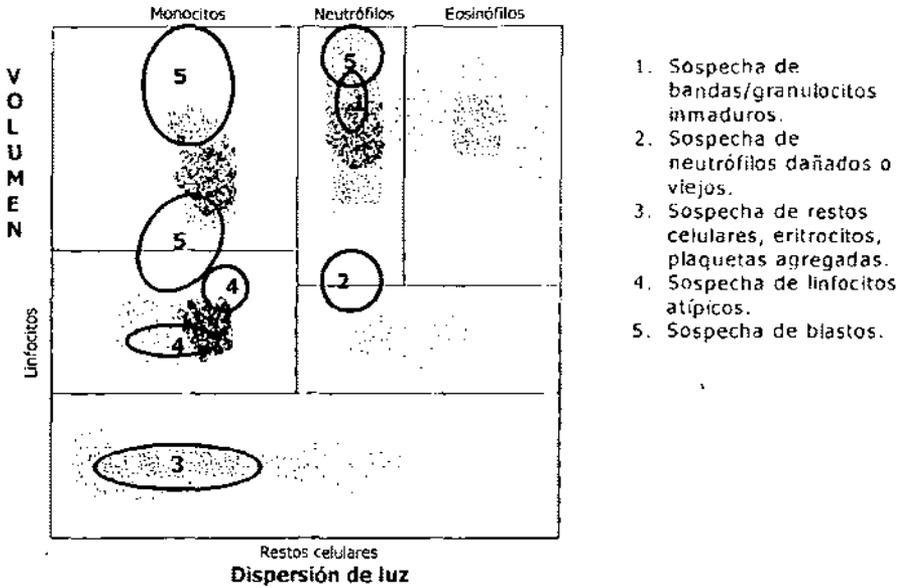


Fig. 2 Localización típica de las poblaciones celulares en un plano bidimensional, generado con la medición de la dispersión de luz (eje de las abscisas) y la medición del volumen (eje de las ordenadas).

La generación actual de analizadores automatizados en hematología, usando algoritmos complejos generados en el *software* de la computadora, tienen la capacidad de detectar poblaciones celulares anormales proporcionando "banderas semi-interpretativas". El Coulter Gen-S identifica anomalías cualitativas ("banderas de sospecha"). Las banderas de sospecha son definidas, internamente

(por el fabricante), vía el *software* de la computadora, y están basadas en anomalías en la medición de la dispersión de la luz, de la conductividad y de la impedancia eléctrica (Cuadro 4). Cuando una población significativa de células caen fuera de la distribución normal en este arreglo tridimensional se genera alguna "bandera" en particular. Estas "banderas de sospecha" de glóbulos blancos incluyen*:

Banderas que requieren revisión morfológica

▪ Granulocitos inmaduros/bandas-2	IGB2
▪ Variante de linfocitos	VL
▪ Blastos de serie linfoide	LiB
▪ Blastos de serie monocítica	MoB
▪ Blastos de serie granulocítica	NeB
▪ Glóbulos rojos nucleados	NRBC
▪ Agregados plaquetarios	PltCl
▪ Plaquetas gigantes	GPt
▪ Revisar frotis	RS

Banderas que no requieren revisión morfológica

▪ Granulocitos inmaduros/bandas-1	IGB1
▪ Población dimórfica de eritrocitos	DiRBC
▪ Eritrocitos micro/fragmentos de eritrocitos	MF-RBC

- Aglutinación de eritrocitos Agg
- Las abreviaturas corresponden a la nomenclatura original de Coulter.

Cuadro 4. Criterios para la señalización con banderas ¹⁴

Región izquierda lejana (R1), aproximadamente 35 fL

- Plaquetas agregadas o gigantes
- Eritrocitos nucleados
- Eritrocitos no lisados
- Crioglobulinemia

Región entre linfocitos y células mononucleares (R2), aproximadamente 90 fL

- Linfocitos atípicos
- Linfocitos anormales
- Blastos
- Células plasmáticas
- Eosinofilia
- Basofilia

Región entre células mononucleares y granulocitos (R3), aproximadamente 160 fL

- Granulocitos inmaduros
- Poblaciones de células anormales
- Eosinofilia

Región derecha lejana (R4), aproximadamente 450 fL

- Cuenta absoluta alta de granulocitos
múltiples banderas
- Presencia de combinación de anomalías

De este modo las células de 35 a 99 fL son clasificadas como linfocitos, las células de 100 a 200 fL son clasificadas como células mononucleares, y las células por arriba de 200 fL son clasificadas como granulocitos (Fig. 3)¹⁴.

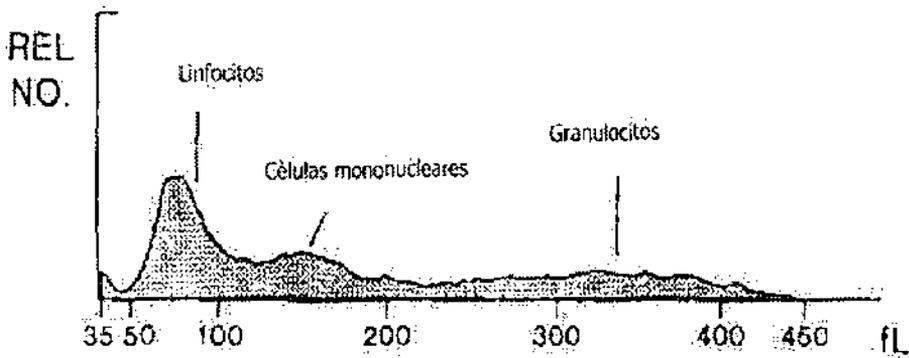


Figura 3. Regiones izquierda (35 fL) y derecha lejana (450 fL). Los leucocitos se muestran divididos en tres grupos: linfocitos, células mononucleares, y granulocitos.

Índices de la eficiencia diagnóstica de una prueba

En 1947, Yerushalmy ¹⁵ introdujo los términos sensibilidad y especificidad como índices estadísticos de la eficiencia de una prueba diagnóstica.

Estos conceptos no necesariamente se restringen a pruebas diagnósticas, ya que se puede aplicar a una variedad de pruebas empleadas para identificar condiciones clínicas. La relación entre condición clínica y el resultado de la prueba comúnmente se muestra en forma de tabla.

CONDICIÓN CONFIRMADA

Resultado de la prueba	<i>Positiva</i>	<i>Negativa</i>
<i>Positiva</i>	Verdaderos positivos (VP)	Falsos positivos (FP)
<i>Negativa</i>	Falsos negativos (FN)	Verdaderos negativos (VN)

En esta tabla el encabezado de las columnas indica la condición confirmada del paciente y las cuatro celdas interiores denotan si el diagnóstico del paciente ha sido correcto o falso. La sensibilidad de una prueba indica su capacidad para realizar un diagnóstico correcto en casos positivos confirmados de la enfermedad.

La especificidad indica la capacidad para realizar un diagnóstico correcto en casos negativos confirmados de la enfermedad.

La sensibilidad es el número de casos verdaderos positivos dividido entre el número total de casos positivos confirmados, el cual es la suma de verdaderos positivos más los casos falsos negativos:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN} \times 100 \%$$

La especificidad debe ser el número de casos verdaderos negativos dividido entre el número total de casos negativos confirmados, el cual es la suma de los verdaderos negativos más los casos falsos positivos:

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP} \times 100 \%$$

En la evaluación de la utilidad diagnóstica de una prueba de laboratorio es también muy importante conocer el valor predictivo de la misma. Conociendo éste se puede saber la probabilidad que tiene un paciente en particular de tener la enfermedad cuando la prueba en cuestión resulta positiva, o de no tener la enfermedad si el resultado de la prueba es negativo. Los valores predictivos se calculan como sigue:

$$\text{Valor predictivo positivo} = \frac{VP}{VP + FP} \times 100$$

$$\text{Valor predictivo negativo} = \frac{VN}{VN + FN} \times 100$$

Objetivos

- 1.- Establecer la eficacia diagnóstica del equipo automatizado Coulter Gen – S para detectar presencia de blastos en sangre periférica de pacientes con leucemia aguda.

Material y métodos

Las citometrías hemáticas de todos los pacientes externos y hospitalizados del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán se procesan en el Laboratorio Central en un equipo Coulter (Coulter Counter modelo Gen S, Coulter Electronics, Hialeah, FL). El equipo se calibra con un control de células sanguíneas parcialmente preservadas (S cal kit, Coulter 7546808) y el control de calidad diario se realiza también con células parcialmente preservadas (5C, Coulter PN7547001) y con una suspensión de partículas de latex para verificar volumen, conductividad y dispersión de la luz (Latron Control 2 Coulter, PN7546914). Para la citometría hemática se emplea sangre anticoagulada con EDTA (1.5 mg/ml).

Al Departamento de Hematología y Oncología del Instituto sólo son remitidas las muestras de sangre de los pacientes con diagnóstico de padecimientos hemato-oncológicos, o de aquellos pacientes que presentan anomalía en los índices eritrocitarios, en la cuenta de leucocitos o de plaquetas o el informe de "bandera de sospecha de blastos" o de otras banderas de sospecha. A estos pacientes se les realiza una cuenta diferencial visual de leucocitos, observación de alteraciones de serie roja en frotis extendido sobre un cubreobjetos y teñido con colorante de Wright y analizado en 100 leucocitos. Esta tarea es realizada por personal altamente calificado y con amplia experiencia en morfología.

Del 1 de febrero al 31 de mayo de 2000 se recabó la información de todas las muestras de sangre que llegaron al Departamento de Hematología para la

realización de una cuenta diferencial de leucocitos por método visual. El estudio se realizó en 371 pacientes.

Análisis estadístico

Se analizó la eficiencia del analizador Gen-S en la identificación de blastos, tomando como “estándar de oro” la observación de estas células anormales en el frotis. Se calculó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo.

Resultados

En la tabla 1 se agrupan los casos en base a los resultados obtenidos en la observación del frotis y en el Coulter Gen-S.

Tabla 1

Blastos Coulter	Blastos morfología		Total
	Sí	No	
Si	41	48	89
No	12	270	282
Total	53	318	371

$$\text{Sensibilidad} = \frac{41}{41 + 12} \times 100 = 77.4 \%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{270}{48 + 270} \times 100 = 84.9 \%$$

$$\text{Valor predictivo positivo} = \frac{41}{41 + 48} \times 100 = 46.1 \%$$

$$\text{Valor predictivo negativo} = \frac{270}{12 + 270} \times 100 = 95.7 \%$$

De los 371 pacientes en 101 se identificaron blastos en cualesquiera de los dos métodos o en ambos métodos, mientras que en 270 pacientes no se identificaron blastos con ninguno de los dos métodos. De los 53 casos con blastos en frotis (41 verdaderos positivos y 12 falsos negativos), 39 correspondieron a leucemia aguda, 11 a pacientes en fase "acelerada" o blástica de leucemia mieloide crónica y 3 a síndromes mielodisplásicos (anemia refractaria con exceso de blastos). Hubo 48 casos con "bandera de blastos" en el reporte del Coulter pero en quienes la presencia de estas células no se confirmó en la cuenta diferencial visual. Siete de éstos con diagnóstico de leucemia aguda, y por lo tanto compatible con presencia de blastos. En 41 casos de los 48 casos falsos positivos los diagnósticos fueron como sigue: 9 casos con leucemia mieloide crónica, 6 con linfoma no Hodgkin, 5 con leucemia linfocítica crónica, 4 con VIH, 3 con neoplasias malignas, 3 con anemia aplásica, 3 con síndrome mielodisplásico, 2 con artritis reumatoide y 1 caso con cada uno de los siguientes diagnósticos: púrpura trombocitopénica idiopática, enfermedad de Hodgkin, lupus eritematoso sistémico, anemia hemolítica autoinmune, talasemia menor, y donador para trasplante de médula ósea (estimulado con factor estimulante de colonias granulocito-monocito). Se revisaron los expedientes de los 7 pacientes con LA (falsos positivos) y en 4 de estos la ausencia de infiltración en aspirado de médula ósea, (realizado en fecha muy cercana a la muestra de sangre periférica evaluada) fue compatible con la ausencia de blastos en sangre periférica por método visual. Un paciente se encontraba en primera recaída establecida por la presencia de 56 % de blastos en

el aspirado de médula ósea. Los otros 2 pacientes no tenían aspirado de médula ósea ya que se encontraban en el período de inducción a la primera remisión (8 y 18 días post inicio de quimioterapia).

Tabla 2

	Leucocitos x $10^3/\mu\text{L}$		Blastos %	
	promedio	oscilación	promedio	oscilación
Verdaderos positivos (41)	54.0	0.4 - 190.0	32	1 - 92
Falsos negativos (12)	5.1	1.0 - 5.4	7.0	1 - 49
Falsos positivos (48)	15.5	0.5 - 75.9	0.0	0 - 0
Verdaderos negativos (270)	6.5	4.5 - 45.9	0.0	0 - 0

En la tabla 2 se muestran los promedios y valores máximo y mínimo de leucocitos y de blastos en los 4 grupos de pacientes. Resulta interesante que el promedio más alto de leucocitos ($54 \times 10^3/\mu\text{L}$), así como también del porcentaje de blastos (32 %) se observó en el grupo de verdaderos positivos, pero también hay que hacer notar que en el grupo de casos falsos negativos en el que los blastos solo se identificaron en el frotis más no fueron detectados por el Coulter, aún cuando el promedio de leucocitos ($5.1 \times 10^3/\mu\text{L}$) y de blastos (7.0 %) fue bajo (10 de los 12 casos tuvieron ≤ 3 % de blastos) hubo dos casos con porcentaje alto de blastos: uno con 16 % y otro con 49 % (Figura 4).

Porcentaje de blastos en los casos verdaderos positivos y falsos negativos

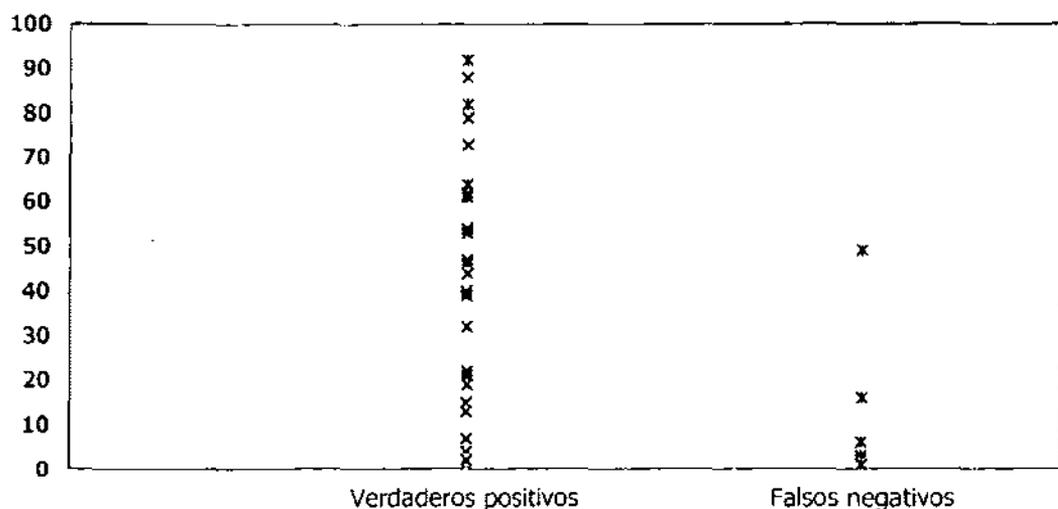


Figura 4. Gráfica en donde se muestra la proporción de verdaderos positivos y falsos negativos encontrados en el estudio

Tabla 3

Banderas	IGB - 2	VL	Blastos		
			LiB	MoB	NeB
Verdaderos positivos (41)	46.3	22.0	49.0	34.0	66.0
Falsos negativos (12)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Falsos positivos (48)	44.0	6.0	21.0	23.0	77.0
Verdaderos negativos (270)	4.5	1.1	0.0	0.0	0.0

IGB - 2 = Neutrófilos inmaduros 2 (metamielocitos, mielocitos, promielocitos); VL = Variante de Linfocitos; LiB = Sospecha de blastos en el área de los linfocitos; MoB = Sospecha de blastos en el área de los monocitos; NeB = Sospecha de blastos en el área de los neutrófilos.

En la tabla 3 se muestra el porcentaje de casos de cada uno de los grupos con presencia de alguna de las 5 principales "banderas". Los casos falsos negativos no sólo no mostraron "bandera de blastos" si no que tampoco lo hicieron con las banderas IGB – 2 o VL. En el grupo de verdaderos positivos y de falsos positivos el porcentaje de casos con las banderas IGB – 2 fue alto (46.3 % y 44 % respectivamente).

Tabla 4

Banderas	NRBC	PltCI	GPIt	SP	LP	RS
Verdaderos positivos (41)	22	0	12	29	7	0
Falsos negativos (12)	2	4	2	6	0	0
Falsos positivos (48)	19	15	10	29	10	13
Verdaderos negativos (270)	9	6	6	21	5	1

NRBC = Glóbulos rojos nucleados; PltCI = Plaquetas agregadas; GPIt = Plaquetas Gigantes; SP = Límite bajo para el volumen plaquetario medio; LP = Límite alto para el volumen plaquetario medio; RS = Verificar diferencial.

En la tabla 4 se anotan el porcentaje de casos de cada uno de los 4 grupos que presentaron banderas cualitativas. Como puede apreciarse estas "banderas" se observaron en un porcentaje bajo de casos. Sólo el 13 % de los 48 casos falsos positivos mostró la "bandera" de "revisar frotis" (RS). Los porcentajes más altos de estas banderas cualitativas se observaron en los grupos de casos verdaderos positivos y falsos positivos, pero nuevamente en el grupo de casos falsos negativos la señalización fue muy escasa.

Discusión

Hasta el inicio de 1960 las citometrías hemáticas se realizaban manualmente. Los métodos empleados eran laboriosos e involucraban centrifugas, espectrofotómetros, cámaras para contar células y frotis de sangre teñidos. De estas mediciones se obtenían los índices eritrocitarios, el número y la cuenta diferencial de leucocitos, la cuenta de plaquetas y los comentarios morfológicos que frecuentemente sugerían diagnósticos específicos.

Desde la introducción en los laboratorios de hematología de los contadores electrónicos de células, que pueden generar todos estos resultados en segundos, los requerimientos laborales se han reducido sustancialmente. La presencia de la mayoría de los leucocitos anormales se puede identificar por la identificación de una serie de "banderas", específicas de cada instrumento. La adición de banderas a los informes esta diseñada para reducir el número de casos falsos positivos y falsos negativos señalando la revisión morfológica de frotis centinela. Aún cuando este adelanto ha sido exitoso, existen aún un buen número de problemas sin resolver, variando en frecuencia de un instrumento a otro ¹⁶. Uno de estos problemas es precisamente la identificación de blastos mediante las "banderas" de señalización ¹⁷.

En el presente estudio analizamos 371 muestras de pacientes con diagnósticos diversos para evaluar la utilidad diagnóstica del autoanalizador en hematología Coulter Gen - S en la identificación, mediante "banderas de blastos"

en sangre periférica. Se obtuvieron valores de sensibilidad (77 %) y especificidad (85 %) un poco más bajos que los informados por otros autores. Así, Bruno y cols.¹⁸ evaluaron la contribución del Coulter VCS para hacer un diagnóstico de LAM. Incluyeron en su estudio 42 pacientes con LAM y 58 donadores normales y obtuvieron una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 93.1 %. Hoyer y cols.² empleando un equipo Coulter STKS y analizando las muestras de sangre de 110 pacientes con leucemia aguda (72 LAM y 38 LAL), encontraron que en el 71 % de las muestras se obtuvo "banderas de sospecha de blastos", acompañadas de otras "banderas de sospecha". En el 20 % hubo sólo la presencia de otras "banderas de sospecha" diferentes de la de blastos, y en el 8.2 % de las leucemias agudas sólo hubo "banderas definitivas" (anormalidades cuantitativas) sin "banderas de sospecha". Además de la "bandera de blastos", las otras "banderas" que de acuerdo a estos autores fueron de mayor utilidad para identificar los casos de leucemia aguda fueron: granulocitos inmaduros/bandas-2; variante de linfocitos y glóbulos rojos nucleados. Los autores concluyen que usando una combinación apropiada de "banderas de sospecha" y "definitivas" que orienten a la revisión microscópica del frotis, el Coulter permitirá identificar prácticamente todos los casos de leucemia aguda que involucre la sangre periférica. Si consideramos exclusivamente las "banderas de blastos" la sensibilidad obtenida por estos autores sería similar a la encontrada en nuestro estudio, sin embargo, nuestros casos falsos negativos no sólo no mostraron "banderas de blastos" si no que tampoco lo hicieron con las banderas de granulocitos inmaduros/bandas-2; variante de

linfocitos y glóbulos rojos nucleados (Tablas 3 y 4) que de acuerdo a Hoyer y cols.² son más sensibles. Es importante enfatizar que tanto el número de leucocitos como el porcentaje de blastos parecen ser un factor importante para que el equipo Coulter Gen-S detecte los blastos, como lo demuestra el hecho que el promedio del número de leucocitos fue significativamente más alto en el grupo de casos verdaderos positivos que en el de los falsos negativos ($54 \times 10^3/\mu\text{L}$ y $5.1 \times 10^3/\mu\text{L}$, respectivamente), así como también en el promedio del porcentaje de blastos: 32 % en los casos verdaderos positivos versus 7 % en los falsos negativos.

El Technicon H*1 es un autoanalizador en hematología que realiza la citometría hemática completa usando dos tecnologías: citoquímica (actividad de la peroxidasa) y dispersión de luz láser (características nucleares de la célula)¹⁹. Dos grupos de investigadores: Kawarabayashi y cols.²⁰ y D'Onofrio y cols.³ evaluaron la utilidad clínica del Technicon H*1. El primer grupo estudió 45 pacientes con LA, 24 con LAL y 21 con LAM. De las 45 muestras, cuatro casos con LAL resultaron falsos negativos, no hubo casos falsos positivos. Cuando 1 % o más de las células fueron blastos por el método visual el sistema automatizado casi siempre marcó "bandera". D'Onofrio y cols.³ para determinar el grado de sensibilidad y especificidad compararon los resultados de "banderas de blastos" del Technicon*1 con aquéllos del examen microscópico en 131 muestras de sangre de 43 pacientes con leucemia aguda en diferentes fases de su enfermedad. De las 34 muestras con 4-95 % de blastos, morfológicamente reconocibles en el frotis de sangre periférica, la sensibilidad del equipo fue del 100 % sin ningún caso falso negativo. Por otro

lado, en 43 muestras la "bandera de blastos" del Technicon H*1 fue positiva en ausencia de cualquier evidencia morfológica de blastos en frotis. Estos "falsos positivos" (aparentemente falta de especificidad) se obtuvieron siempre de pacientes leucopénicos que tenían infiltración de blastos en médula ósea de más del 12 %, comparado con valores de 0-6 % encontrados en pacientes con "bandera de blastos" del Technicon H*1 negativa. Para estos autores la "bandera de blastos" del Technicon H*1 es altamente sensible en la detección en sangre periférica de aún una pequeña concentración de células leucémicas las cuales escapan a la identificación morfológica. Al respecto, resulta importante comentar que de los 48 casos falsos positivos de nuestro estudio, en 7 con diagnóstico de LA se podría haber escapado la presencia de blastos mediante identificación morfológica visual, sin embargo, sólo en uno de estos pacientes por encontrarse en recaída, se podría establecer la superioridad del Coulter Gen-S en la sensibilidad para identificar blastos en sangre periférica. Los resultados de dos estudios realizados en el Technicon H*1 sugieren que el sistema de "banderas" de este equipo es útil para el diagnóstico y seguimiento de las leucemias.

Parecería que los equipos que emplean el principio de impedancia como son los Coulter presentan una tasa de resultados falsos positivos más alta que por ejemplo los equipos Technicon, esta impresión es compartida por Mayer K.²¹

La influencia de incluir en la población de estudio a pacientes con una amplia gama de padecimientos, diferentes del padecimiento que se desea evaluar, se ejemplifica en los resultados obtenidos por Simmons y Elbert ²². Estos autores

emplearon un equipo Technicon (Hemalog D) para identificar células anormales e incluyeron en su estudio muestras de pacientes con diferentes enfermedades hematológicas, y obtuvieron 0.8 % de resultados falsos negativos y 12 % de casos falsos positivos. Estos valores son comparables con los obtenidos en nuestro estudio en el que los porcentajes de casos falsos negativos y falsos positivos fueron del 3.2 % y del 12.9 %, respectivamente.

Conclusiones

1. Los valores diagnósticos del equipo automatizado en hematología Coulter Gen-5 para la identificación de blastos en sangre periférica fueron: sensibilidad de 77.4 %, especificidad de 84.9 %, valor predictivo positivo de 46.1 % y valor predictivo negativo de 95.7 %.
2. El valor predictivo negativo de 95.7 % permite afirmar que en presencia de una muestra que no presente "banderas de blastos" es poco probable que estas células leucémicas se identifiquen en el examen microscópico del frotis.
3. Por los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos es necesario que todas las muestras con "banderas de blastos", o aquellas que provengan de pacientes con sospecha clínica de leucemia aguda se realice el examen microscópico del frotis teñido con Wright en busca de células leucémicas.

Referencias

ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

1. Ransohoff DF, Feinstein AR. Problems of spectrum and bias in evaluating the efficacy of diagnostic tests. *N Engl J Med* 1978; 926-30.
2. Hoyer JD, Fisher CP, Soppa VM, Lantis KL, Hanson CA. Detection and classification of acute leukemia by the Coulter STKS hematology analyzer. *Am J Clin Pathol* 1996; 106: 352-8.
3. D'Onofrio G, Mancini S, Leone G, Bizzi B, Mango G. Identification of blast cells in peripheral blood through automatic assessment of nuclear density: a new tool for monitoring patients with acute leukaemia. *Br J Haematol* 1987; 66: 473-7.
4. Ruiz Argüelles GJ, Mc Arthur JR. Leucemias agudas. *Fundamentos de hematología*. Ruiz Argüelles GJ. Editorial Médica Panamericana. 2ª. Ed. México. 1998; 180-197.
5. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. *Patología estructural y funcional*. Schoen FJ Ed. 5ª ed. McGraw-Hill-Interamericana. 1995; 695-742.
6. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR and Sultan C, The French-American-British (FAB) Co-operative Group. The morphological classification of acute lymphoblastic leukaemia: concordance among observers and clinical correlations. *Br J Haematol* 1981; 47: 553-61.
7. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR and Sultan C, The French-American-British (FAB) Co-operative Group. Proposal for

- the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-M0).
Br J Haematol 1991; 78: 315-29.
8. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR and Sultan C, The French-American-British (FAB) Co-operative Group. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. Ann Intern Med 1985; 103: 626-29.
 9. Kinney M, Lukens JN. Differentiation of the acute leukemias. In Wintrobe's clinical hematology. Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM. Eds 10th ed. Williams & Wilkins. 1999; 2209-40.
 10. Perkins SL. Examination of the blood and bone marrow. In Wintrobe's clinical hematology. Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM. Eds 10th ed. Williams & Wilkins. 1999; 9-35.
 11. Grimaldi E, Scopacasa F. Evaluation of the Abbott Cell-Dyn 4000 hematology analyzer. Am J Clin Pathol 2000;113:497-505.
 12. Koepke JA. Quantitative blood cell counting. In practical laboratory hematology. Koepke JA. 1th ed. Churchill Livingstone. 1991; 43-60.
 13. Cornbleet PJ, Myrick D, Levy R. Evaluation of the Coulter STKS five part differential. Am J Clin Pathol 1993; 99: 72-81.
 14. Pierre RV. Leukocyte differential counting. In practical laboratory hematology. Koepke JA. 1st ed. Churchill Livingstone. 1991; 131-156.

15. Feinstein AR. On the sensitivity, specificity, and discrimination of diagnostic tests. In *Clinical Biostatistics*. 1st ed. Saint Louis: The C.V. Mosby Company. 1977: 214-26.
16. Pierre RV. The routine differential leukocyte counts vs automated differential counts. *Blood cells* 1985; 11: 11-23.
17. Ward PCJ. The CBC at the turn of the millennium: an overview. *Clin Chem* 2000; 46: 1215-1220.
18. Bruno A, Del Poeta G, Venditti A, Stasi R, Adorno G, Aronica G, Suppo G, Di Rienzo AM, Lazzoni R, Tribalto M, Caravita T, Masi M, Papa G. Diagnosis of acute myeloid leukemia and system Coulter VCS. *Haematologica* 1994; 79: 420-28.
19. Krause JR, Costello RT, Krause J, Panchansky L. Use of the Technicon H-1 in the characterization of leukemia. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112: 889-94.
20. Kawarabayashi K, Tsuda I, Tatsumi N, Okuda K. Leukemic blasts detected by the Technicon H-1 blood cell counter. *Am J Clin Pathol* 1987; 88: 624-7.
21. Mayer K. Presence of abnormal cells. *Blood cells* 1985; 11: 25-30.
22. Simmons A, Elbert G. Hemalog-D and manual differential leukocyte counts. A laboratory comparison of results obtained with blood of hospitalized patients. *Am J Clin Pathol* 1975; 64: 512-7.