

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

CARRERA DE BIOLOGÍA

**"La instrumentación automatizada en hematología como
herramienta importante en el diagnóstico clínico y el papel de la asesoría
y capacitación especializada en su manejo".**

**TESIS POR EXPERIENCIA PROFESIONAL QUE PARA OBTENER EL
TITULO DE :
BIOLOGO
PRESENTA
JUAN GUILLERMO RODRÍGUEZ MIRANDA**

LOS REYES IZTACALA

JUNIO 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

*No acabarán mis flores,
no cesarán mis cantos.
Yo cantor los elevo,
se reparten, se esparcen.
Aun cuando las flores
se marchitan y amarillean,
serán llevadas allá,
al interior de la casa
del ave de plumas de oro*

Nezahualcóyotl
(1 Conejo, 1402 - 6 Pedernal, 1472)

A MIS PADRES: ESTELA Y GUILLERMO, por su incansable soporte y enseñanzas de vida.

A MI HIJO: GIAMO SEBASTIAN OBERON, por ser el único motor que funcionó en momentos de tempestad

A JAQUELINE: por enseñarme el significado de la palabra AMISTAD

A DOBERETE: por rebelarme el secreto de cómo capturar peces tomándolos de los dientes

A LETICIA ESPINOZA: por su amistad, su apoyo, sus consejos y sus valiosísimas palabras de aliento.

A HÉCTOR MONTES: por su enorme ayuda y perenne amistad.

A LOS DIOSES: por darme, cuando ha sido estrictamente necesario, la fuerza suficiente para superar obstáculos sumamente complicados.

ÍNDICE

	Página
Objetivo	5
Resumen	6
Introducción	7
La capacitación	8
Concepto de capacitación	9
Fines de la capacitación	10
Los contadores hematológicos	11
Fundamento de las diferentes tecnologías en los Contadores Hematológicos	
- Impedancia	13
- Tecnología de dispersión óptica	14
- Volumen	15
- Conductividad	17
- Medidas simultáneas	18
Citometría de Flujo	18
- Optimización de medidas de citometría de flujo	20
- Principales aplicaciones de Citometría de flujo	21
- Conteo automatizado de reticulocitos	23
Patrones de Pulso	25
Interpretación dependiente de la Tecnología	
Curvas de distribución	
- Leucocitos	26
- Eritrocitos	27
- Plaquetas	27
Sistemas de reactivos	28
Indices hematométricos	
- Volumen Corpuscular Medio	29
- Hemoglobina Corpuscular media	30
- Concentración Media de Hemoglobina Corpuscular	30
- Amplitud de Distribución Eritrocitaria	31
- Amplitud de distribución Plaquetaria	31
- Volumen Plaquetario Medio	31
Calibración	32
Control de Calidad	35
Ventajas de un Contador Hematológico	36
Desventajas de un Contador Hematológico	37
Propuesta de guía general para la capacitación de analizadores automatizados de hematología	38
Conclusión	40
Referencias Bibliográficas	42
Apéndice	44

RESUMEN

El Laboratorio Clínico es una herramienta primordial para la rama médica, ya que por medio de este se diagnostican diferentes patologías y además se realizan estudios para establecer el tipo de tratamiento que se debe administrar al paciente, al igual que el seguimiento del mismo.

En nuestros días los laboratorios de diagnóstico clínico se enfrentan cada vez más a la necesidad de utilizar herramientas de diagnóstico más sofisticadas, como los analizadores automatizados, que necesariamente requieren, para su manejo, de una capacitación adecuada que permita que el analista clínico entregue resultados fiables, con interpretaciones adecuadas que ayudarán en buena medida a los médicos a dar el tratamiento adecuado a la enfermedad de un paciente.

Una de las áreas del diagnóstico clínico más antiguas, que son requeridas con mayor frecuencia por los médicos es la hematología; disciplina que estudia precisamente a los componentes sanguíneos y que permite un diagnóstico general del estado de salud del paciente, de ahí su importancia vital. (McKenzie, 1988).

En algunos laboratorios de diagnóstico clínico de nuestro país se sigue utilizando la Cámara de NewBauer, que por muchos años resultó de utilidad, pero que en la actualidad, dado el desarrollo de nuevas tecnologías, ofrece datos inexactos y de confiabilidad dudosa debido a que en su uso intervienen diferentes factores que pudieran incidir en la cuenta de los eritrocitos y plaquetas. La cuenta de leucocitos, cuando es realizada por un técnico experto, es aceptable para fines clínicos, pero está también cada vez más en desuso debido a la presencia creciente de los contadores electrónicos. Dichos instrumentos fueron desarrollados en la década de los 50 por Wallace Coulter.

Los más recientes contadores de células sanguíneas totalmente automatizados aspiran y diluyen una muestra de sangre y determinan de 8 a 29 parámetros relacionados con los eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Muchos de ellos también identifican la muestra (por ejemplo, por la lectura de un código de barras), homogenizan y la transportan para la aguja aspiradora, verificando si el volumen de la muestra fue adecuado y si no hay coágulos. Algunos están conectados a una máquina automática para preparar laminillas (frotis) y colorearlas.

Para evitar al máximo la manipulación innecesaria de los especímenes sanguíneos por parte de los operadores del instrumento, cada vez se hace más frecuente la toma mediante la perforación del tapón del tubo de ensayo donde la sangre está contenida. Toda esta tecnología con que funciona, además de las características del software, mantenimiento y la información requerida para que un usuario este bien capacitado y opere de manera adecuada un instrumento automatizado de hematología, hace indispensable el papel del capacitador, que es sumamente importante en la correcta información de los resultados arrojados, dentro del universo del diagnóstico clínico.

INTRODUCCION.

En algunos laboratorios de diagnóstico clínico de nuestro país se sigue utilizando la Cámara de Newbauer, reconocida en la actualidad por ofrecer datos inexactos y de confiabilidad dudosa debido a que en su uso intervienen diferentes factores que pudieran incidir en la cuenta de los eritrocitos. La cuenta de leucocitos, cuando es realizada por un técnico experto, es aceptable para fines clínicos, pero está también cada vez más en desuso debido a la presencia más frecuente de los contadores hematológicos electrónicos. Dichos instrumentos fueron diseñados en la década de los 50 por Wallace Coulter. Los aparatos detectan los pulsos de conductividad originados por el paso de los glóbulos a través de un orificio por el cual fluye una corriente eléctrica. Los pulsos son contados y un ordenador, teniendo en cuenta la dilución, el volumen aspirado y la coincidencia estadística del paso simultáneo de más de una célula por dicho orificio, convierte a número de glóbulos por μl de sangre. El

resultado es desplegado en la actualidad en una pantalla digital ó a través de una impresora anexa. Se debe enfatizar en la necesidad de experiencia y cuidado de los operadores en el manejo de los contadores electrónicos, pues los errores groseros son comunes y deben ser detectados en el acto.

Una segunda generación de equipos surgió a finales de la década de los 60 y rápidamente se ganó la preferencia de los usuarios en los países desarrollados. El Coulter Modelo S fue el contador de grandes dimensiones más vendido en la década de los 70 y a pesar de ser muy costoso en cuanto a su precio y mantenimiento, llegaron unos cuantos a nuestro país. Existió un equipo del Modelo S en la clínica del Instituto Mexicano del Seguro Social de Xochimilco, que aún se encontraba en funcionamiento hasta 1999.

Aún en los años 70s la Technicon lanzó el primer contador capaz de identificar a los leucocitos por medio de citometría de flujo, a través de canales de histoquímica e integrando un conjunto de mediciones, presentando un hemograma completo (Failace, 1995).

Dado que existe un cambio radical entre las técnicas manuales que aún se utilizan dentro de los laboratorios de análisis clínicos y el uso de herramientas mas sofisticadas, es absolutamente necesario que los analistas clínicos reciban la capacitación adecuada para la utilización de los instrumentos automatizados, pero sobre todo que entiendan los fundamentos teóricos aplicados a la tecnología con la que dichos equipos trabajan para que ocupen e interpreten de manera adecuada los resultados arrojados por los mismos.

LA CAPACITACION.

El fenómeno de la educación es tan antiguo como el hombre mismo. El proceso de aprendizaje, eje de toda acción educativa y de entrenamiento, era elemental en los primeros intentos por enseñar e intercambiar habilidades en los pueblos primitivos. Los aprendices, que se conocen desde 2000 años A.C. y la estructura de los gremios y asociaciones constituyen un antecedente remoto de la actual educación. Con el surgimiento de la Era Industrial - 1ª mitad

del siglo XVIII – aparecen innumerables escuelas industriales cuyas metas son lograr el mayor conocimiento de los métodos y procedimientos de trabajo, en el menor tiempo posible.

Es importante señalar que las dos guerras sufridas en el siglo pasado (1ª. y 2ª. Guerra Mundial) dieron lugar al desarrollo de técnicas de entrenamiento y capacitación intensiva cuyos métodos han llegado a aplicarse en la industria. En 1940 se comenzó a entender que la labor del entrenamiento debía ser una función organizada y sistematizada, en la cual la figura del instructor adquiere especial importancia. En los años 70s en México toma relevancia el entrenamiento tanto en empresas privadas como públicas (Siliceo,1986).

CONCEPTO DE CAPACITACIÓN.

El adiestramiento se entiende como la habilidad o destreza adquirida, por regla general, en el trabajo preponderantemente manual. Desde este punto de vista el adiestramiento se imparte a los empleados de menor categoría y a los obreros en la utilización y manejo de máquinas y equipos.

La capacitación incluye el adiestramiento, pero su objetivo principal es proporcionar conocimientos, sobre todo en los aspectos técnicos del trabajo. En esta virtud la capacitación se imparte a empleados, ejecutivos y funcionarios en general, cuyo trabajo tiene un aspecto intelectual bastante importante (Siliceo,1986).

Dos puntos básicos destacan el concepto de capacitación:

- 1.- Las organizaciones en general deben dar las bases para que sus colaboradores tengan la preparación necesaria y especializada que les permita enfrentarse en las mejores condiciones a su tarea diaria.
- 2.- No existe mejor medio que la capacitación para alcanzar altos niveles de motivación y productividad en los empleados.

Es una actividad planeada y basada en necesidades reales de una empresa y orientada hacia un cambio en los conocimientos, habilidades y actitudes del colaborador (Bohlander,2003). La capacitación no es una actividad mecánica rígida; por el contrario, es un evento eminentemente humano que exige cooperación y compromiso de todos los involucrados en ella, dado que busca generar o modificar el comportamiento del personal (Mendoza,1986).

FINES DE LA CAPACITACIÓN

Contar con un personal efectivo, actualizado, motivado y desarrollado con el fin de aminorar la ignorancia o bien la obsolescencia de conocimientos e

incrementar la eficiencia por parte de los empleados, abonando necesariamente al desarrollo de la propia empresa.

En el caso de los analistas del laboratorio clínico es sumamente importante destacar que su labor es de riesgo dado que su objeto de trabajo son muestras biológicas de origen humano, que algunas veces pueden ser potencialmente infecciosas, lo que implica que deban ser tratadas con sumo cuidado, así como el material utilizado para contener, transportar o analizar a las mismas, conocimientos con los que previamente debe contar el analista.

ANTECEDENTES

Los contadores hematológicos.

Por 1960 Wallace Coulter desarrolló los primeros principios para la medición y cuenta de células. Coulter descubrió que utilizando una sonda electromagnética de alta frecuencia podría obtener información tanto cualitativa como cuantitativa al respecto del contenido celular. Para 1970, Wallace Coulter describió su método "El instrumento es un sistema de medición óptico que promueve un rango de medición que excede las 6000 células individuales por segundo". Una suspensión de células sanguíneas es pasada a través de un pequeño orificio simultáneamente con una corriente eléctrica". Las células individuales pasadas a través del orificio producen un cambio de impedancia eléctrica (resistencia) que está determinado por el tamaño de la célula. El sistema cuenta a las células individualmente y promueve su distribución por tamaños. El número de células contadas por el instrumento es unas 100 veces mayor que la cuenta tradicional por medio del microscopio, reduciendo así errores estadísticos aproximadamente en 10 veces.

Los más recientes contadores de células sanguíneas totalmente automatizados aspiran y diluyen una muestra de sangre y determinan de 8 a 29 parámetros relacionados con los eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Muchos de ellos también identifican la muestra (por ejemplo, por la lectura de un código de barras), homogenizan y la transportan para la aguja aspiradora, verificando si el volumen fue adecuado y si no hay coágulos. Algunos están conectados a una máquina automática para preparar laminillas (frotis) y colorearlas.

Para evitar al máximo el manoseo innecesario de los especímenes sanguíneos por parte de los operadores del instrumento, cada vez se hace más frecuente la toma mediante la perforación del tapón del tubo de ensayo donde la sangre está contenida. Con excepción de la medición de la hemoglobina (Hb), los otros parámetros dependen de la cuenta y medida de las partículas, sean éstas eritrocitos, leucocitos o plaquetas.

Las partículas pueden ser contadas y medidas ya sea por impedancia o por dispersión de luz. Los instrumentos automatizados poseen por lo menos 2 canales o cámaras de cuenta: a una de ellas le es adicionado un diluyente a la muestra para que una vez homogenizada sean contados y medidos los eritrocitos; a la otra cámara con muestra se le adiciona además del diluyente un agente lisante, para reducir los eritrocitos a estroma, dejando intactos a los leucocitos que serán entonces medidos y contados a la vez que dicha muestra ya homogenizada permite la medición de hemoglobina. Son necesarios más canales para que un instrumento sea capaz de realizar una cuenta diferencial de leucocitos y dicha cuenta depende del sometimiento de las células a diferentes metodologías de medición, por ejemplo por la tecnología de impedancia eléctrica con diferentes frecuencias, por la dispersión o por la absorbancia de luz. Para la cuenta de reticulocitos podría ser necesario otro canal u otro instrumento.

Los instrumentos automatizados no consiguen identificar todas las normalidades o anormalidades como el ojo humano. Están proyectados para llevar acabo cuentas sanguíneas exactas y reproducibles en especimenes normales o que presenten apenas anormalidades numéricas tanto como para que alerten al operador del instrumento debido a que el espécimen presenta características inusitadas que puedan dar origen a determinaciones inexactas o que exijan la revisión de la muestra por medio de un frotis. Esto último es generalmente conocido como alarma (*flagging*).

Los motivos por los cuales dichas alarmas pueden aparecer son generalmente los siguientes: Cuando la cuenta de la sangre contiene células blásticas, granulocitos inmaduros, eritroblastos ó linfocitos atípicos. Cuando en la muestra existan plaquetas gigantes ó agregadas ó por cualquier motivo que haga imposible la separación de las poblaciones de eritrocitos y plaquetas y cuando existe alguna anormalidad que pueda originar resultados espurios.

OBJETIVO.

"Aportar información acerca de la importancia de la Atención Técnica Especializada, que puede proporcionar un capacitador con formación profesional, en el manejo de los Instrumentos Automatizados de Hematología de los Laboratorios de Diagnóstico Clínico, para la obtención de resultados adecuados y su correcta interpretación".

Para evitar al máximo la manipulación innecesaria de los especímenes sanguíneos por parte de los operadores del instrumento, cada vez se hace más frecuente la toma mediante la perforación del tapón del tubo de ensayo donde la sangre está contenida. Toda esta tecnología con que funciona, además de las características del software, mantenimiento y la información requerida para que un usuario este bien capacitado y opere de manera adecuada un instrumento automatizado de hematología, hace indispensable el papel del capacitador, que es sumamente importante en la correcta información de los resultados arrojados, dentro del universo del diagnostico clínico.

FUNDAMENTO DE LAS DIFERENTES TECNOLOGÍAS EN LOS CONTADORES HEMATOLÓGICOS.

Impedancia.

Las células sanguíneas son malas conductoras de la electricidad. Cuando una columna de células pasa inmersa en un medio conductor a través de una pequeña abertura por la cual circula una corriente eléctrica, hay un aumento considerable de la impedancia eléctrica en la abertura a medida que cada célula pasa; ese aumento es proporcional al volumen de material conductor dislocado, por tanto al volumen celular. Así son contadas y medidas las células a partir de los pulsos eléctricos que generan. Este es el principio de conteo por impedancia, conocido también como principio Coulter, dado que fue Wallace Coulter quien lo describió en las décadas de los 40 y 50 del siglo pasado e iniciando con ello la era moderna del conteo automatizado de las células sanguíneas.

La impedancia de la apertura es determinada por la capacitancia y la inductancia, además de la resistencia. Diversos factores, además del volumen celular influyen en la amplitud, la duración y la forma del pulso, relacionados con la alteración de las líneas eléctricas de fuerza y con el desplazamiento del medio conductor. Tanto la forma como el volumen celular son relevantes, de modo que si las células pueden elongarse, estas, cuando pasan por la abertura de conteo pueden aparentar ser menores de lo que verdaderamente son, en tanto que las células que son rígidas aparentan ser de mayor tamaño. Debido a eso las células que pasan por la apertura fuera del centro producen impulsos aberrantes y parecen ser mayores de lo que realmente son. Las células tienden a recircular por el borde del campo eléctrico, produciendo un impulso menor de aquel producido por células semejantes al pasar por la abertura: un eritrocito circulante puede producir un pulso eléctrico semejante al de una plaqueta pasando por la apertura.

Las células que pasan al mismo tiempo por la abertura son contadas y medidas como una única célula y la falta de exactitud ocasionada por esta situación requiere de ser corregida, lo que es conocido como corrección por coincidencia. Los impulsos aberrantes pueden ser editados electrónicamente. Una solución al problema del paso de las células a través de la apertura de una manera no centrada puede ser solucionada mediante un enfoque hidrodinámico, orientando de esta forma mediante presión de fluidos a las células a pasar centradas a través de la misma y con ello reduciendo los problemas producidos por la coincidencia y por los impulsos aberrantes. Tanto el flujo centrado como el flujo de barrido del otro lado de la apertura evitan la recirculación de las células y su posible conteo por duplicado o triplicado.

Los contadores de impedancia producen determinaciones precisas y reproducibles del volumen celular y del contenido y concentración de hemoglobina. Hay no obstante algunas inexactitudes inherentes al método, las cuales aumentan cuando las células son anormales. El pulso eléctrico producido por el paso de una célula por la zona del sensor puede ser considerado como una sombra eléctrica de la célula, sugiriendo una partícula de determinado tamaño y forma. El efecto de la forma de la célula no es igual en todos los contadores de impedancia (Bain, 2004).

Tecnología de Dispersión Óptica

Las medidas de Dispersión Óptica son cargadas en el Banco de datos Óptico. Generalmente los contadores hematológicos incluyen un sistema de Celda Óptica de Flujo, un Sistema de Iluminación y un Sistema de Detección. El Sistema de Flujo Óptico Celular induce a las células a un flujo que pasará a través de un canal rectangular interno de la Celda de Flujo Óptico. El Sistema de Iluminación está compuesto de una luz polarizada verticalmente. El eje óptico de un láser de potencia a una longitud de onda de 488nm, que es proyectado y enfocado al flujo de la muestra. Cuando las células pasan a través del eje del láser enfocado 5 mediciones de cada célula son hechas simultáneamente por un subsistema de detección, que consiste de cinco

detectores ópticos y corresponden a coletas ópticas de ángulos delantero y lateral (Abbott, 2000).

La dispersión de luz ocurre cuando el haz de luz láser choca contra una célula y cambia de dirección. En un Citómetro de Flujo los detectores perciben la luz que fue dispersada y la convierten en pulsos eléctricos que son enviados a una computadora para su almacenamiento y análisis. Las señales contienen informaciones sobre características celulares tales como el tamaño, complejidad, granulosidad citoplasmática y lobularidad nuclear, que son aprovechadas en la identificación de células. Esas características pueden ser inferidas por la medición de la luz dispersa, a ciertas fajas de ángulos relativos para el eje de luz (Abbott, 2000).

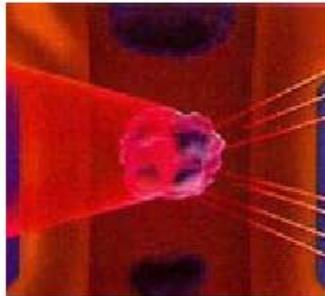


Figura 1 – Caracterización celular utilizando la tecnología de dispersión de luz.(Beckman Coulter. Manual del STKS 1992).

Volumen

La tecnología de Volumen, Conductividad y dispersión láser (VCS,) es un mecanismo por el cual los analizadores de hematología realizan la determinación de los diferentes tipos de leucocitos: neutrofilos, linfocitos, monocitos, eosinofilos y basofilos y utiliza el principio Coulter de la impedancia eléctrica para medir el volumen celular total, en un diluyente isotónico.

Este método mide exactamente el tamaño de las células independientemente de la orientación y camino de la luz y es aceptado mundialmente como método de referencia para la medición volumétrica. Un flujo de corriente eléctrica es establecido entre dos electrodos dentro de una celda de flujo. Estos electrodos son posicionados a cada lado de la abertura.

A medida que los leucocitos, mantenidos en su estado nativo, pasan a través de la apertura aumentan la resistencia y producen una disminución de voltaje directamente proporcional a su tamaño; es decir, entre mayor sea el tamaño de la célula provocarán una resistencia mayor que será traducida en un pulso eléctrico de mayor tamaño. La tecnología emplea la luminosidad exacta para medir el volumen celular, por que estas dos informaciones son útiles para corregir las señales de conductividad y láser, lo que da dos medidas que son muy eficaces y únicas.

El tamaño es una característica distinta en la identificación de los leucocitos, entretanto algunas células son similares en su tamaño, más son diferentes en otras formas de medición (Beckman-Coulter 2004).

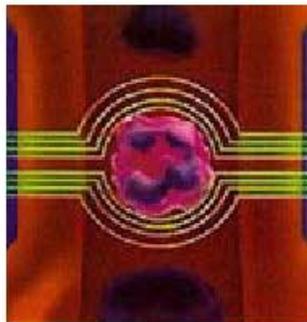


Figura 2 - Célula utilizando la tecnología de VCS y dando una visualización del tamaño celular. (Beckman-Coulter, 1992).

Conductividad

La conductividad es una medida del contenido celular utilizando una onda electromagnética de alta frecuencia. La pared celular es conductiva cuando es expuesta a una corriente de alta frecuencia. A medida que la corriente de radiofrecuencia pasa a través de la célula las variaciones de los constituyentes granulares y nucleares de la célula y su composición química son detectados. Esta eficaz tecnología es usada para obtener informaciones sobre el tamaño y estructura interna de la célula, incluyendo la composición química y el volumen nuclear (Campos, 2002).

La conductividad ayuda a diferenciar las células de tamaño similar, pero de composición diferente. Por ejemplo, los linfocitos pequeños y los basófilos aparecerían como una sola población si fuesen medidas solamente por su volumen. La medida de conductividad, va a detectar diferencias pronunciadas en relación al contenido celular, citoplasmático y a la granulosidad (Coulter, 1992).

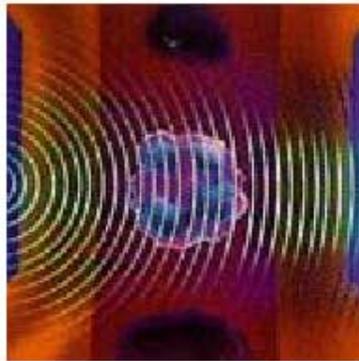


Figura 3 - Célula utilizando ondas eletromagnéticas de alta frecuencia, donde podemos diferenciar células con composición diferente. (Beckman-Coulter, 1992).

Medidas simultáneas

La tecnología VCS, patentada por Coulter se lleva a cabo en un canal individual que usa 3 fuentes diferentes e independientes de energía para analizar aproximadamente 8192 células, muy similares a su estado natural, al mismo tiempo. Las tres mediciones son obtenidas simultáneamente a través de 256 canales obteniendo más de 16 700 000 posibilidades de localización de datos, con los cuales las células con características similares irán a formar pares distintos.

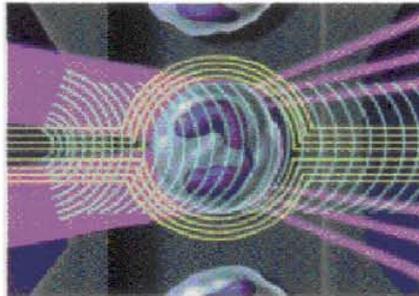


Figura 4 - Célula al momento de ser sometida a las 3 metodologías al mismo tiempo: volumen, dispersión de la luz y conductividad. (Beckman-Coulter, 1992).

CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo puede ser definida como un proceso de conteo y dimensionamiento de las propiedades celulares o de partículas, siendo transportadas por un flujo hasta una zona sensible. El flujo enfocado es usado para hacer hileras de una célula detrás de la otra o de otras partículas biológicas para que a cada una de ellas le sea posible realizar las mediciones requeridas. Ya en la zona de los sensores las características físicas o químicas de las células ó partículas son medidas, cuando el proceso de medición es totalmente automatizado.

Las características básicas de un citómetro de flujo son: contiene un sistema de muestreo y de preparación de la muestra totalmente automatizado, que tiene una zona de sensores y una zona de recolección de datos de exhibición de los resultados. Algunos equipos como por ejemplo el Cell-Dyn 4000 utilizan las siguientes tecnologías de citometría de flujo para medir los parámetros hematológicos: Tecnología de Dispersión Óptica/Fluorescencia, que es usada para analizar las muestras para WBC's (Leucocitos), NRBC's (eritroblastos), RETCs (reticulocitos) y PLT's (plaquetas). Es también usada para contar RBC's (eritrocitos) durante medidas de PLT como revisión de la calidad de impedancia de RBC. La tecnología de Impedancia Eléctrica es usada para contar y dimensionar RBC's y PLT's y también usada para contar PLT's como revisión de la calidad del conteo óptico de PLT's.

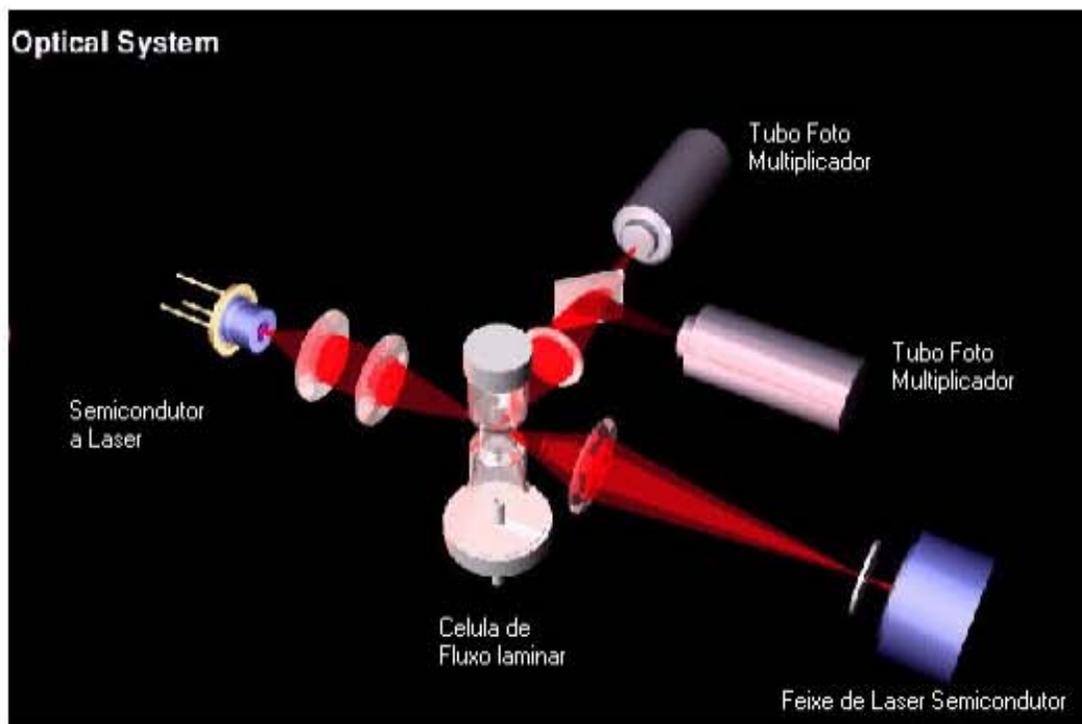


Figura 5- Principio Semiconductor de Citometria de Flujo. (Sysmex XE, 2003).

Optimización de Medidas de Citometría de Flujo.

Generalmente son usadas las siguientes Técnicas para obtener resultados óptimos en ambas mediciones, tanto la de Dispersión Óptica como en la de Fluorescencia Eléctrica.

- **Enfoque Hidrodinámico.** Ésta Técnica asegura el que atraviesen las células a analizar de manera ordenada, a través de una zona de sensores. Una cantidad de líquido libre de células envuelve a la muestra diluida a través de una diferencia de presiones, lo que ocasiona que las células queden formadas en una hilera de una célula tras otra. Este hecho permite evitar que una célula sea medida como de mayor tamaño al pasar cerca de una de las orillas de la apertura; por el contrario, la célula será obligada a pasar por el centro de dicha apertura.

Otra consecuencia de éste enfoque hidrodinámico es que evita que se formen aglutinaciones celulares a lo largo de las estrechas tuberías cercanas a la celda de flujo, pues mantiene a las células lejos de las paredes de las pequeñas mangueritas.

- **Corrección por Coincidencia.** Existe un Fenómeno conocido como coincidencia que puede afectar el conteo de las células. La coincidencia ocurre cuando dos o más células pasan al mismo tiempo a través de la apertura. Cuando ocurre dicha coincidencia durante las mediciones de impedancia, ocurre un gran pulso de voltaje en lugar de dos o más correspondiente a cada una de las células, por lo que el conteo final de las células será menor (Abbott, 2000).

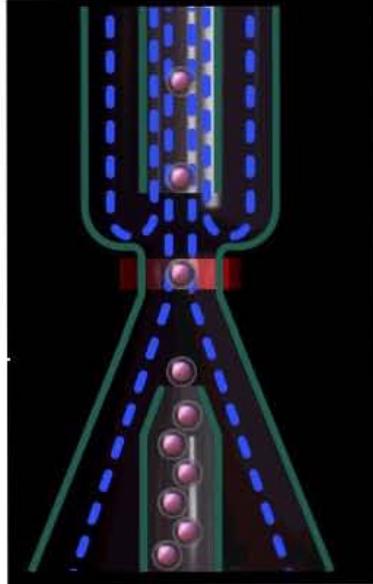


Figura 6- Técnica de Enfoque Hidrodinámico. (Sysmex 2004).

Principales Aplicaciones de Citometría de Flujo.

- Cuantificación de subpoblaciones de linfocitos en los Síndromes de Inmunodeficiencia congénita o adquirida;
- Identificación del origen celular de leucemias y linfomas.
- Determinación de ploidía de poblaciones celulares por la cuantificación de ADN.
- Pronóstico de Leucemias.

- Identificación de células tumorales en la orina y fluido de derrames.
- Conteo de reticulocitos por el marcado de ARN;
- Identificación de células primitivas en la sangre periférica.
- Búsqueda de antígenos HLA en los linfocitos (Failace,1995).
- Conteo automatizado de reticulocitos.

Conteo automatizado de reticulocitos.

La mayoría de los conteos automatizados de reticulocitos depende de la capacidad de combinación de diferentes fluorocromos con el ARN de los reticulocitos. Las células fluorescentes pueden entonces ser contadas en un citómetro de flujo. Los fluorocromos también se combinan con el ADN, tornando fluorescentes a las células nucleadas. Hay otra tecnología que se basa en la tinción del RNA, por medio de un colorante para ácidos nucleicos, no fluorescente, tal como el nuevo azul de metileno o la oxacina 750. Los reticulocitos son detectados por absorbancia ó dispersión de luz. En general los reticulocitos pueden ser distinguidos de los leucocitos, de los eritrocitos nucleados y de las plaquetas por medio de un umbral volumétrico y por su absorbancia de luz o por la intensidad de fluorescencia. Los conteos de reticulocitos son expresados como conteos absolutos o como un porcentaje del número total de eritrocitos. En virtud del enorme número de células contadas, los conteos automatizados de reticulocitos son mucho más productivos que aquellos realizados manualmente. Es de esperarse que los conteos automatizados sean más exactos pues es eliminado el componente subjetivo de la identificación de los reticulocitos más tardíos, con apenas uno o dos gránulos de material teñido.

El conteo automatizado puede ser alterado por:

- Elección del fluorocromo;
- El tiempo de exposición de sangre al fluorocromo;
- La temperatura en que fuera mantenida la muestra después de la mezcla;
- La posición de los umbrales: umbral superior, para excluir las células nucleadas fluorescentes y el inferior para excluir a la fluorescencia de fondo.

Las mismas consideraciones pueden ser aplicadas a los conteos automatizados de reticulocitos que emplean colorantes no fluorescentes del ácido nucleico. Los límites de referencia para los conteos automatizados de reticulocitos son, por lo tanto, específicos para cada tipo de instrumento. Entonces los métodos y por tanto los límites de referencia establecidos varían considerablemente. Aún es necesario tomar en cuenta el conteo manual para decidir si una variación representa “la verdad”. De manera ideal, los conteos automatizados y los conteos manuales deben presentar buena correlación, siendo los promedios semejantes y pequeño el intercepto sobre el eje y de la línea de regresión de los conteos automatizados sobre los conteos manuales.

El conteo automatizado de reticulocitos baja con el envejecimiento de la sangre *in vitro*, lo cual parece deberse a la maduración. Eso también ocurre con los conteos manuales, pero por la imprecisión de dichos conteos la variación es poco notoria. En sangre conservada a 4°C, el conteo es estable por 72 horas más que a temperatura ambiente y baja un 5% en 24 horas y 10% en 48 horas. Los conteos deben realizarse idealmente dentro de las primeras 6 horas de tomada la muestra. Dichos conteos automatizados de reticulocitos pueden ser realizados en un citómetro de flujo de uso general, como el modelo FACscan de Becton Dickinson ó el EPICS XL, de Beckman Coulter ó puede

hacerse también en un contador específico para reticulocitos, como los modelos R-1000, R-2000 ó R-3000 de Sysmex.

Un conteo de reticulocitos es útil para determinar si una anemia es causada por falta de producción en la médula ósea ó “por excesiva desnutrición de eritrocitos”. Por causa de la mayor precisión, el conteo automatizado también es útil para monitorear la respuesta a un tratamiento con eritropoyetina en la insuficiencia renal crónica y para detectar la recuperación de la médula en el tratamiento de la anemia aplásica, después de un transplante o después de quimioterapia antitumoral.

Los contadores automatizados de reticulocitos igualmente pueden proveer los índices de inmadurez de los reticulocitos, pues la intensidad de la fluorescencia o la absorción del colorante del ácido nucleico es proporcional a la cantidad de ARN de la célula. Los instrumentos pueden clasificar a los reticulocitos en baja, media y alta fluorescencia, indicando un grado creciente de inmadurez, pudiendo fornecer la medida de la fluorescencia. Tales medidas pueden tener significado clínico. En la anemia causada por hemólisis o pérdida de sangre el porcentaje de reticulocitos inmaduros se eleva con el crecimiento del conteo total de reticulocitos.

Cuando no hay eritropoyesis, entretanto, el porcentaje de reticulocitos inmaduros puede estar elevado, a pesar de un conteo total normal ó reducido. Eso fue observado, por ejemplo, en la leucemia mieloide aguda, en los síndromes mielodisplásicos, en la anemia megaloblástica y en la anemia aplásica. Un aumento desproporcionado de reticulocitos inmaduros indica una maduración anormal de los mismos (Bain, 2004).

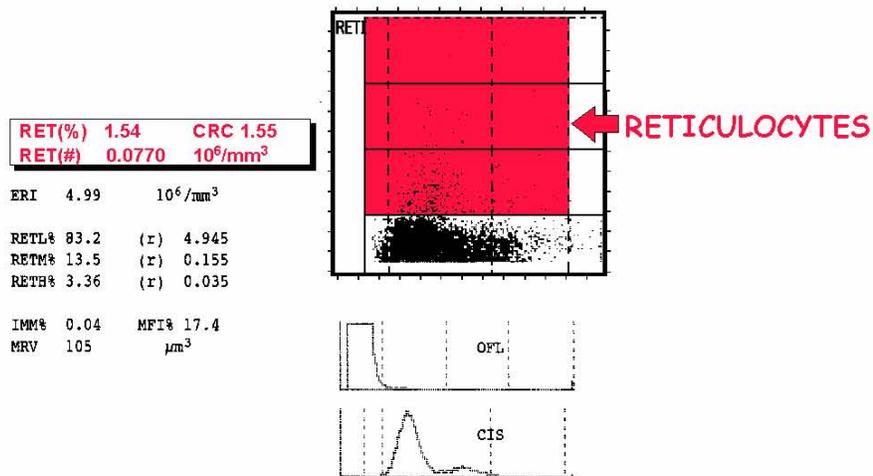


Figura 7- Gráfico de Dispersión que muestra varias fracciones de inmadurez de reticulócitos. Resultado de equipo Pentra 120 Retic ABX (Horiba, 2001).

Patrones de Pulso

El objetivo de los contadores hematológicos es contar y medir partículas. Esto es basado en que las células, que son pobres conductoras de la electricidad, van a interrumpir el flujo de la corriente eléctrica. Las células son suspendidas en un diluyente con conductividad y pasan a través de las aperturas impulsadas por una fuerza de vacío. Esto produce momentáneamente un aumento de resistencia al flujo de corriente, que es traducido como un pulso que es detectado y contado por el instrumento como una partícula. La amplitud ó directamente el pico de cada pulso está relacionado con el tamaño (volumen) producido por la partícula.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DEPENDIENTE DE LA TECNOLOGÍA.

CURVAS DE DISTRIBUCIÓN.

Leucocitos.

Las curvas de distribución de leucocitos tienen una escala de 35 a 450 fL, pero es extrapolada de 30 a 450fL. Los datos son visualizados usando un sistema de promedios móviles para producir las curvas de distribución. El analizador cuenta las partículas mayores de 25fL como leucocitos. Los eritrocitos son eliminados de este análisis por el agente lisante mientras que las plaquetas caen por debajo del umbral de 35fL.

Después de realizar la corrección por coincidencia y los procedimientos de verificación internos el analizador multiplica el conteo de leucocitos por un factor de calibración. Además de que los leucocitos son contados, son clasificados por su tamaño por un analizador de altura de los pulsos. En muestras normales, la población de leucocitos aparece con un aspecto redondeado y compacto.

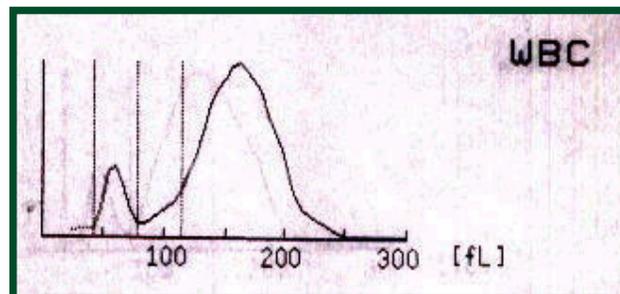


Figura 8- Curva de distribución de leucocitos de acuerdo con la metodología de impedancia. (Sysmex XE 2100, 1999).

Eritrocitos.

La curva de distribución de los eritrocitos tiene una escala de 36 a 360fL, pero es proyectada de 24 a 360fL. Los datos son visualizados utilizando un sistema de promedios móviles para producir la curva de distribución. La dilución de eritrocitos contiene eritrocitos, leucocitos y plaquetas, los cuales son separados por los umbrales de tamaño y pulsos. Los datos son analizados y corregidos por coincidencia y durante los periodos de conteo tanto para eritrocitos como para leucocitos se verifica la existencia de variaciones anormales (Campos, 2002).

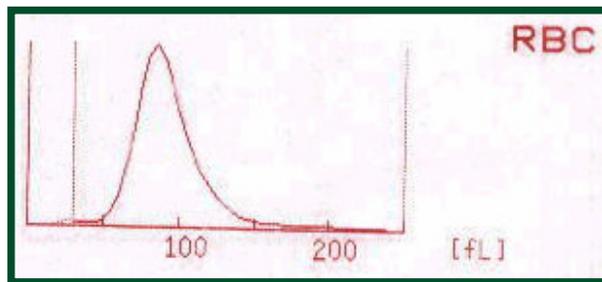


Figura 9- Curva de distribución de los eritrocitos. (Sysmex 2100, 1999).

Plaquetas.

La distribución normal de las plaquetas está proyectada en dos curvas, ambas utilizando datos medios. Estas curvas tienen una distribución positiva. La curva suavizada está derivada de los datos brutos y es proyectada de 2 a 20fL. La curva ajustada es usada para derivar el conteo de plaquetas y fluctúa de 0 a 70 fL, más solamente es proyectada de 0 a 36fL. El histograma de las plaquetas normales tiene una configuración típica (logarítmica) normal. El resultado de las plaquetas aparece con una alarma R. El histograma de las plaquetas también muestra la presencia de plaquetas gigantes. La curva ajustada indica que ellas también fueron incluidas en el conteo.

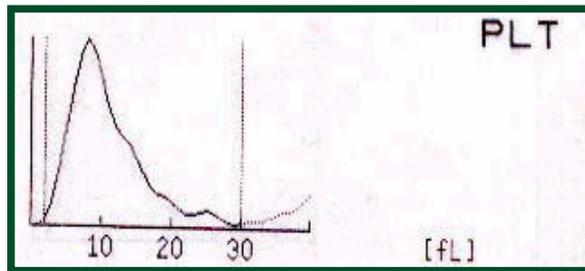


Figura 10- Curva de distribución normal de las plaquetas. (Sysmex 2100, 1999).

SISTEMAS DE REACTIVOS

Un factor esencial para distinguir a los diferentes tipos de células comienza con la propia célula. Para que el ojo humano pueda ver diferencias los constituyentes de las células necesitan ser resaltados con colorantes y después aumentados en su tamaño por medio del microscopio. El proceso de coloración y la mayoría de los otros métodos de tratamiento químico pueden alterar algunas de las características.

Se utilizan dos reactivos en los contadores hematológicos. La solución hemolizante para la lectura de los leucocitos, linfocitos y proporción de hemoglobina, donde con el uso de este reactivo ocurre la lisis de los eritrocitos. Y un líquido de recubrimiento isotónico, que es una solución electrolítica balanceada y altamente filtrada, para la dilución de células sanguíneas.

Estos reactivos trabajan en conjunto para acentuar las diferencias inherentes a los diferentes tipos celulares sin la necesidad de coloraciones especiales. El volumen, el contenido citoplasmático y nuclear y las características de la superficie celular permanecen intactas (Bain,2004).

INDICES HEMATOMÉTRICOS.

VCM (Volumen Corpuscular Medio)

El volumen corpuscular medio (VCM) fue creado por Wintrobe, en la década de los 30, por la división del hematocrito entre el número de eritrocitos. Esto le permitió mostrar que existen anemias caracterizadas por eritrocitos mayores ó menores al tamaño promedio, como la observación microscópica ya lo sugería. Eso fue --posible gracias al profesionalismo y al desempeño técnico del personal de su laboratorio, que hacían conteos de eritrocitos al microscopio con cuidado extremo y por duplicado en los casos de anemia que debían esclarecer. La generalización del cálculo de VCM y de su uso para clasificar anemias se hizo con la finalidad de corregir la absoluta falta de reproducibilidad y exactitud de los mismos conteos, cuando son hechos en serie, por técnicos comunes, en laboratorios comunes y mucho peor que eso, cuando son inventadas por el laboratorista.

Los contadores electrónicos actuales diluyen la sangre en el sistema y simultáneamente cuentan y miden los eritrocitos por el principio Coulter o por difracción de rayos láser. El VCM obtenido es notablemente reproducible y probablemente exacto. La exactitud es apenas probable, por que no hay ley física que convierta matemáticamente un pulso de conductividad en fentolitros. La conversión es necesariamente arbitraria y los números podrían no ser exactamente los mismos si hubiesen sido escogidos otros parámetros de conversión. Pero eso en nada perjudica la interpretación: Los eritrocitos de tamaño igual tendrán un VCM igual. La macrocitosis y la microcitosis son ahora datos de confianza; el VCM renació y es ahora el parámetro más importante para el diagnóstico diferencial de laboratorio, de los diversos tipos de anemia.

El VCM varia con la edad, de 106 +/- 5 fL en el recién nacido y disminuye rápidamente hasta 100 +/- 6 fL a los 15 días; continúa decreciendo hasta los 74 fL a los 6 meses y de ahí por el resto de la vida es igual tanto en hombres como en mujeres. Macrocitosis es la elevación del VCM encima del 98 (ó 100) fL. Y claro que si un paciente tuviera un VCM de 90fL en varios hemogramas

anteriores, VCM de 82 fL ó de 97 fL en la hemoglobina actual deberán ser interpretados como micro ó macrocitosis respectivamente.

HCM (Hemoglobina Corpuscular Media)

La hemoglobina corpuscular media (HCM) es calculada dividiendo la concentración de hemoglobina entre el número de eritrocitos presentes en el mismo volumen de sangre; en la práctica, $HCM = Hbg \times 10 / E$. Con la tecnología primitiva no era exacto ni reproducible, por que el conteo de eritrocitos no era fidedigno. Con la tecnología actual es una cifra exacta, más es inútil: La HCM, en amplia faja es paralela al VCM, esto es, glóbulos grandes tienen mucha hemoglobina, glóbulos pequeños tienen poca. Es fortalecida en los resultados apenas por tradición, satisfaciendo a los médicos, habituados a verla y los fabricantes de instrumentación, que pueden citar más de un parámetro generado por el equipo.

CHCM (Concentración Media de Hemoglobina Corpuscular)

La concentración promedio de hemoglobina dentro de los eritrocitos (CHCM), calculada por el cociente HCM/VCM, es notablemente constante en la faja de la normalidad. Esta constancia es usada para el control de los resultados en los contadores de canales múltiples: CHCM fuera de la faja exige una averiguación más detallada de las cifras que le dieron origen. Las causas más comunes de la elevación ilegítima son: la presencia de crioaglutininas, los errores descritos en la concentración de hemoglobina y la hemólisis del material.

Los aumentos reales de la CHCM (entre 35 y 37%) pueden ocurrir en la esferocitosis y en el coma hiperosmolar, por deshidratación de los eritrocitos; el mismo fenómeno existe cuando hay un exceso de EDTA en la sangre coagulada. Fuera de esas eventualidades, la CHCM elevada es imposible por que representa el límite de saturación de los eritrocitos. Cuando hay una deficiente síntesis de hemoglobina en los eritroblastos (como falta de hierro, por ejemplo) el volumen de los glóbulos disminuye proporcionalmente a la falta

de contenido y la concentración de hemoglobina se mantiene normal. Curiosamente la CHCM es un índice a ser mantenido en la interpretación de los hemogramas hechos con tecnología primitiva.

RWD (Amplitud de Distribución Eritrocitaria)

El parámetro que indica la presencia de subgrupos de eritrocitos por la medida electrónica del volumen de los mismos, es la amplitud de distribución eritrocitaria (RWD). Como son medidos uno a uno, la computadora del instrumento da cuenta de todos los números, genera una curva de frecuencia con volumen en fentolitros en la abcisa y el número de células en la ordenada. La curva denominada histograma, es muy útil en el análisis de la población de eritrocitos. En sangres normales es aproximadamente Gaussiana y estrecha; la medida es el VCM. La amplitud de variación de una distribución Gaussiana es medida por el desvío patrón: la computadora lo calcula pero lo expresa de manera más racional, como porcentaje de medida, esto es, como coeficiente de variación. Esa cifra es fortalecida en los resultados con la denominación de RDW (red blood cell distribution width = amplitud de distribución de los eritrocitos). El RDW normal está entre 11 y 14(%).

PDW (Amplitud de Distribución Plaquetaria)

La amplitud de distribución plaquetaria (PDW), es un índice que mide la anisocitosis plaquetaria (su variación en tamaño). Una mezcla de plaquetas grandes y pequeñas tal vez nos muestre un Volumen Plaquetario Medio (VPM) normal, pero una amplitud de distribución plaquetaria alto. Esto podría ser el indicativo de una liberación activa de plaquetas.

VPM (Volumen Plaquetario Medio).

El Volumen Plaquetario Medio (VPM) es la medición realizada y calculada por una máquina, del tamaño promedio de las plaquetas en la muestra del paciente. Las plaquetas nuevas son más grandes y conforme pasa el tiempo éstas van disminuyendo su tamaño. Un MPV incrementado sucede cuando un

número alto de plaquetas está siendo producido, o sea que éste índice es de utilidad para que el médico pueda inferir sobre el estado de producción de plaquetas en la médula ósea del paciente.

CALIBRACIÓN

La calibración es una parte fundamental del programa de garantía de calidad del laboratorio hematológico. Un calibrador es una sustancia identificada con una preparación de referencia ó material, usado para calibrar o ajustar una medición. La lista de comprobación del Colegio de Patólogos Americanos establece que las técnicas de calibración aceptables incluyen:

- El uso de muestras múltiples analizadas de sangre total y el uso de una preparación manufacturada, estabilizada y certificada de células rojas, células blancas ó plaquetas.
- La lista de comprobación continúa, habla que todas las técnicas de calibración deben incluir verificaciones periódicas de hemoglobina del analizador contra una preparación de hemoglobina certificada (ICSH/WHO, Patrón Internacional de Hemoglobina-Cianuro) material que haya recibido la certificación de su fabricante y que derive del padrón internacional de cianuro de hemoglobina, usando los procedimientos de referencia. (Beckman Coulter, 2001).

Varios calibradores comerciales fueron comercializados para la calibración de los analizadores hematológicos. Los valores – estándares son atribuidos por instrumentos calibrados frecuentemente con sangre integral; para tal, son utilizados procedimientos de referencia.

Esas suspensiones de células sanguíneas son generalmente adecuadas para la calibración, desde que las instrucciones del fabricante sean rigurosamente seguidas. La calibración por medio de los calibradores comercializados es muy fácil y rápida que aquella realizada a partir de sangre

completa por métodos de referencia y por duplicado y probablemente dará un resultado mejor.

Si el laboratorio no posee un calibrador comercial o si surgieran dudas en cuanto a su validez puede haber necesidad de una calibración con sangre completa. Debe ser utilizada sangre normal recién colectada para la calibración conforme Brittin (1969) y Bessman (1977). La hemoglobina está determinada por el método de cianometahemoglobina usando un patrón y fotómetro certificado. El hematocrito es determinado por la técnica del microhematocrito. Las hematimetrías y leucometrías son efectuadas con analizadores monocanales. Para los eritrocitos es efectuada una dilución de 1:50,000 en una única etapa, para que sea reducido el error. Se usa una pipeta de $2\text{ l} \pm 0.25\%$ para adicionar la sangre en $100\text{ ml} (\pm 0.08)$ de Isoton en un matríz volumétrico (opcionalmente pueden ser empleadas pipetas de 5ul, 10 ó 20ul de precisión similar, para la adición de sangre en 250, 500 ó 1000ml de diluyente, respectivamente). La sangre para la leucometría es diluida en 1:500, también con una pipeta, $20\text{ ul} \pm 0.25\%$ de sangre en 10 ml de Isoton.

Cada una de las etapas precedentes es efectuada por triplicado (cada dilución es leída y duplicada) en sangre recién colectada de 10 a 20 personas normales. En caso de que sea deseable, el hematocrito puede ser corregido por la sustracción del porcentaje medio del plasma retenido, encontrado en el hematocrito de personas normales (Internacional Council for Standardization in Haematology ICSH, 1980) Se estima que ese porcentaje se sitúa entre 1.5 y 3 % (Dacie,1991).

Las muestras de sangre normal son procesadas por triplicado en el instrumento y en seguida se obtiene la media de los resultados. La diferencia entre los valores del procedimiento de referencia y del analizador hematológico es determinada para cada muestra, de modo que pueda ser calculada la diferencia porcentual.

En seguida es procesada una muestra normal en el analizador y los valores son reajustados en el instrumento, mediante su multiplicación por el factor de corrección apropiado. Por ejemplo, si los valores para la hemoglobina detectados en el instrumento fueran en media, 5% más bajos que los valores de referencia obtenidos por el método de la cianometahemoglobina, la hemoglobina obtenida por el analizador deberá ser multiplicada por 1.05 y ese valor deberá ser utilizado en el reajuste del instrumento. Es importante que esa calibración no sea mudada hasta que haya sido estadísticamente demostrado un “alejamiento” de esos valores, por medio de procedimientos de control de calidad. En esa ocasión, después de haber sido efectuados los procedimientos de reparación y manutención del instrumento, este será calibrado por medio del mismo procedimiento descrito.

Los reajustes de la calibración no deben ser mudados con base en una única determinación de una suspensión celular de control. Los analizadores más modernos son estables, habitualmente no hay necesidad de recalibrarlos con frecuencia.

El método de calibración descrito suministra valores para los índices eritrocitarios de los contadores de células comparables con los valores calculados a partir de métodos individuales. Excepto que los valores de referencia reflejen una ligera diferencia como consecuencia de la corrección del hematocrito para el plasma retenido. Está claro que en los disturbios en que el plasma retenido está considerablemente aumentado (no microhematocrito) en función de la rigidez o forma de los eritrocitos, por ejemplo en casos de anemia ferropénica y en la anemia falciforme (anemia en la cual las hematíes tienen forma de guadaña), el hematocrito y el VCM serán bajos y el CHCM ligeramente más elevado en la determinación en analizadores electrónicos, comparativamente a los métodos convencionales. Probablemente el instrumento presenta los valores más correctos (Henry, 1999).

CONTROL DE CALIDAD

La sangre control es una sustancia usada en la práctica de rutina para monitorear el funcionamiento de un proceso analítico: el equipamiento. Es importante recordar que antes de proceder al procesamiento de las sangres control para revisar la exactitud y precisión del equipamiento, es importante verificar que el sistema completo esté trabajando apropiadamente (Beckman Coulter, 2001).

Pueden ser utilizadas las muestras de sangre para controles comercializados, ese tipo de muestras deben ser procesadas cada mañana y a intervalos durante el día. Como todo ese procedimiento es engorroso y el aislamiento no es satisfactorio, Brittin (1971) discutió ese problema en su excelente revisión sobre la instrumentación. Además Brittin presentó un método útil de utilización de las muestras de sangre del paciente para el control de calidad. Él demostró que todos los siete valores (conteo leucocitario, conteo eritrocitario, Hb, Ht e índices) son estables en la sangre colectada con EDTA por lo menos 24 horas a 4°C.

En el primer día, son colectadas al menos 5 ó 10 muestras con valores hematológicos que se ubican dentro de la faja normal, las cuales son mantenidas en refrigeración y reanalizadas al segundo día. La tendencia de desvío a lo largo del día puede ser monitoreada por la repetición del procedimiento dos veces al día ó más simplemente, por el procesamiento de dos ó tres muestras del primer lote de la mañana a intervalo durante el día (Henry, 1999).

Este método detectará una pérdida de calibración en desenvolvimiento, como el que podría ser ocasionado por un desvío electrónico.

Sin embargo, una pérdida significativa de la calibración, que ocurra más abruptamente como consecuencia de una falla mecánica ó electrónica, no podría ser detectada sino hasta el día siguiente. Bull (1974,1973) demostró que el cálculo para un promedio móvil para VCM, HCM y CHCM de cada 20 muestras sucesivas procesadas en el analizador a lo largo del día, proporciona un indicador efectivo y de fácil obtención para la pérdida de calibración. Ese indicador se basa en la constancia demostrada de los valores medios para esos índices en hospitales de tamaño mediano y grande, de un día para el otro, de una semana para la otra. Si la media móvil cambia en cerca de 3%, la calibración deberá ser averiguada inmediatamente.

VENTAJAS DE UN CONTADOR HEMATOLÓGICO.

Son diversas las ventajas que los contadores hematológicos proporcionan a sus usuarios, dentro de las cuales destacamos como cualidades primordiales la rapidez y precisión en el diagnóstico hematológico. Destacamos la capacidad de análisis de entre 90 y 150 biometrías/hora, por lo menos 10 000 células en promedio son examinadas para cada serie. Normalmente los contadores hematológicos aceptan todas las marcas de tubos siendo estos con EDTA y un volumen de muestra que va de los 40µl-300µl (en promedio 120µl). Podemos encontrar hoy en el mercado contadores que poseen Sistema Abierto o Sistema Cerrado y principalmente con exactitud, precisión, linealidad, sensibilidad y especificidad. Los contadores utilizan varios reactivos para su funcionamiento y en general al menos dos tecnologías de conteo y análisis celular: Impedancia, Histoquímica, Óptica; Láser, Citometría de Flujo, Radiofrecuencia, Volumen y Conductividad.

Los histogramas nos pueden proporcionar la distribución poblacional de eritrocitos (RBC), leucocitos (WBC), Basófilos, Eosinófilos, Reticulocitos, viabilidad celular y los más actualizados pueden ofrecer otros índices hematimétricos como el RDW, el HDW (amplitud de distribución corpuscular de la hemoglobina), MPV (volumen plaquetario medio), PDW (amplitud de distribución volumétrica plaquetaria), PCT (plaquetocrito) y otros.

DESVANTAJAS DE UN CONTADOR HEMATOLÓGICO.

Los contadores, por más modernos que sean aún no consiguen distinguir formas de algunas células como lo hace el ojo humano al visualizar una lámina al microscopio. Normalmente en el eritrograma las siguientes observaciones microscópicas pueden no ser vistas: policromasia, ovalocitos, esferocitos, acantocitos, hematíes espiculados, estomatocitos, hematíes falciformes, en lágrima, eliptocitos, esquizocitos, Roleaux, punteado basófilo, anillos de Cabot, corpúsculos de Howell-Jolly, hematozoarios (Tripanosoma, Plasmódium, larvas, Filaria). No se diga el leucograma donde no pueden ser vistos: gránulos

tóxicos, vacuolas tóxicas, corpúsculos de Döhle, anomalía de Pelger-Hüet, Alder-Reilly, neutrofilos hipersegmentados, plasmocitos, linfocitos activados, linfocitos con vacuolización, blastos pequeños y homogéneos.

CONCLUSIÓN

Entre las novedades y facilidades traídas por los contadores hematológicos, se encuentra el hecho de que permiten resultados más rápidos, precisos y confiables al profesional de Análisis Clínicos. Cada vez más laboratorios son equipados con modernos contadores hematológicos y los incentivos para la adquisición de los mismos aumentan de forma sorprendente, provocando con este hecho que exista una mayor necesidad de actualización por parte de los nuevos profesionales.

Es de suma importancia la optimización y modernización de los actuales laboratorios, para que la calidad, precisión y rapidez de los resultados alcancen índices cada vez más confiables. Más, de nada vale la tecnología si detrás de esos inventos, no están profesionales especializados, calificados y comprometidos con la conclusión de todo el proceso de análisis.

Dentro del proceso total de la modernización de los métodos de diagnóstico clínico, entre los cuales está implícita la adquisición de equipamiento con tecnología de avanzada por parte de los laboratorios, juega un papel indispensable el capacitador en el uso de dichos analizadores, pues sin su intervención es absolutamente seguro que los usuarios del laboratorio (llámense técnicos ó químicos) se hallarían imposibilitados para darle el uso adecuado tanto en el mantenimiento como en el procesamiento de muestras y la interpretación de los resultados arrojados por el instrumento; además de la importancia de llevar a cabo un control de calidad idóneo para confirmar de este modo la fidelidad de los resultados.

Un capacitador con formación profesional, puede aportar sugerencias o recomendaciones en el manejo de las muestras, estructurar manuales para la operación del equipo y proponer modificaciones pertinentes para hacer mas confiables los resultados que se obtienen a partir del empleo de estos instrumentos.

Es importante hacer mención que un biólogo puede realizar de una manera adecuada y eficiente el trabajo de capacitador de instrumentos de diagnóstico clínico, dentro del área de hematología, pues el cúmulo de información recibido dentro de la carrera, adquiriendo conocimientos de materias como: biología celular, fisicoquímica, microbiología, fisiología animal, histología, protozoología, química y bioquímica, solo por mencionar las que de manera directa se relacionan al diagnóstico clínico, además del contacto directo que se tiene a lo largo de la carrera con cierto tipo de instrumentos de análisis y el manejo de muestras biológicas (aunque no necesariamente se traten de instrumentos de diagnóstico clínico, el simple hecho de utilizarlos facilita claramente el aprendizaje de los métodos mediante los cuales dichos equipos funcionan), ayudan a una rápida asimilación de los conocimientos necesarios para poder realizar la labor de enseñanza a los usuarios sobre la forma correcta de utilizar los analizadores de diagnóstico clínico y las implicaciones de hacerlo de esa manera o de una forma inadecuada.

De esta manera, al abarcar un rango tan amplio de conocimientos la Carrera de Biología proporciona las bases que permiten tal versatilidad en sus egresados que rápidamente pueden desempeñar actividades que en apariencia no pertenecen al objetivo directo de estudios de la Carrera, pero que sin los conocimientos adquiridos sería prácticamente imposible realizar las labores requeridas para ser un capacitador eficiente en el manejo de instrumentos de diagnóstico clínico.

PROPUESTA DE GUÍA GENERAL PARA LA CAPACITACIÓN DE ANALIZADORES AUTOMATIZADOS DE HEMATOLOGÍA.

Es importante hacer mención que solo se puede hacer una descripción general de los temas que deben ser tratados en la capacitación de los instrumentos de hematología, dado que la diversidad de éstos es muy basta y en el mercado del diagnóstico clínico se encuentran equipos muy básicos que pueden reportar resultados de 8 parámetros, de una manera semiautomática (basados exclusivamente en la metodología de impedancia eléctrica), pasando por analizadores que reportan 10, 18 ó más de 20 parámetros (que necesariamente involucran más de una tecnología para su funcionamiento), los cuáles pueden ser totalmente automatizados y hasta ligados a un sistema de interconexión de dos o más instrumentos de diferentes disciplinas del diagnóstico clínico.

Lo anterior hace evidente que no es lo mismo el software y hardware de un instrumento pequeño y que reporta pocos parámetros a aquel que es para alto rendimiento; ambos, necesariamente requieren de procedimientos de limpieza y mantenimiento muy distintos.

1.- Presentación y fundamento del equipo

- Principio Coulter
- Descripción del Analizador del cual se impartirá capacitación (software y hardware)
- Descripción del Impresor anexo en caso de que requiera de uno
- Juego de Reactivos que el analizador utiliza en su funcionamiento
- Respuesta a dudas de los usuario

2.- Procedimientos Iniciales y Finales

- Start Up (proceso de inicio del equipo)
 - Conteo de Fondo
 - Revisión Electrónica

- Control de Calidad
- Cómo procesar muestras
- Shut Down (proceso de finalización del equipo)
- Respuesta a dudas de los usuarios

3.- Explicación de los diferentes menús del software del instrumento

- Set Up (configuración inicial del instrumento)
- Procesar Muestras
- Control de Calidad en el instrumento.

4.- Procedimientos Especiales

- Procedimientos de Limpieza
- Mantenimiento preventivo y correctivo
- Reemplazo de Reactivos
- Reemplazo de la cinta de Impresión, tuner o papel térmico, en su caso

5.- Calibración

- Prueba de Reproducibilidad
- Prueba de Acarreo
- Calibración del Analizador

6.- Interpretación de Resultados

- Alarmas H y L (alto y bajo)
- Valores normales (rangos)

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

Abbot, 2002. **Manual del Usuario. ABBOTT CELL- DYN® 4000 System.** p.1-37.

Abbott, 2000. **Manual del Usuario. ABBOTT CELL - DYN® 3500 System**

Bain, B.J. **Blood Cells. A Practical Guide.** 3.ed. Blackwell Science. Oxford. UK. 2001. p.40-59.

Gilmer PR Jr, Bessman JD. **Improved classification of anemias by MCV and RDW.** Scand J Haematol.1977; 19: 327. ...

Beckman Coulter. **Manual de Procedimientos para el Control de la Estabilidad Extendida®.** Noviembre del 2001. p.37-39.

Beckman Coulter. **Catálogo del Sistema de hematología Coulter modelo STKS®.** Miami, 1992.

Bohlander G. et al. 2003. **Administración de Recursos Humanos** 12ª. ed. THOMSON. España, pág. 179

Brittin G.M. et al. 1969. **Stability of blood in commonly used anticoagulants. Use of refrigerated blood for quality control of the Coulter Counter Model S.** Am J Clin Pathol. Dec; **52**(6):690–694

Campos, J.M. **Manual de Entrenamiento en Hematología.** Brasil. 2002. p.1-13.

Coulter, B. **Catálogo del Sistema de hematología Coulter modelo STKS®.** [s.d]. Miami, 1992.

Dacie, J.V. y S.M. Lewis. 1991. **Practical Haematology**. Churchill Livingstone. UK. 453pgs.

Failace, R. **Hemograma - Manual de Interpretação**. 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas,1995. p.12-20.

Gutiérrez E. et al. 2001. **Organización y Gestión del área de Trabajo del Laboratorio de Diagnóstico Clínico**. Editex. España

Henry, J.B. 1999 **Diagnósticos Clínicos e Tratamiento por Métodos de Laboratorio**. 19ª.ed. Manole. São Paulo,. p.554-584.

MEDICINA (Buenos Aires). Volume 59-Nº1,1999. Disponible en: <http://www.medicinabuenosaires.com/vol59-99/1/rdw.htm>. Acceso el 15 de Marzo de 2004.

Mendoza, N. A. 1986. **Manual para Determinar Necesidades de Capacitación**. TRILLAS. México. Pág. 35-37

Munhoz, M.A.G. **Hemograma: Mitos, Curiosidades, Nuevos Conceptos**. HC-FMUSP. São Paulo: 2003. Disponible en: <http://www.sbpc.org.br/site/pdf/hemograma.pdf>>. Acceso el 20 de Julio de 2004.

Roche 2003. **Manual de Pre-entrenamiento del modelo XE-2100® de ROCHE**. USA.. p.1-70.

Siliceo A. Alfonso 1986. **Capacitación y Desarrollo de Personal**. 2ª. ed. LIMUSA. México. Pág. 12 – 15.

Sysmex,1999. **Manual del Usuario Sysmex® 1500**. USA. Pág. 8 – 24.

APÉNDICE

Parámetros de Contadores Hematológicos

Parámetros		
Recuento de Leucocitos	Recuento de Eritrocitos	Recuento de plaquetas
Recuento y % de Neutrófilos	Hemoglobina	Volumen Plaquetario Medio(VPM)
Recuento y % de Linfocitos	Hematocrito	
Recuento y % de Monocitos	Volumen Corpuscular Medio (VCM)	Para investigación
Recuento y % de Eosinófilos	Hemoglobina Corpuscular Media (HCM)	Plaquetocrito
Recuento y % de Basófilos	Concentración de Hemoglobina Corpuscular media(CHCM)	Ancho de distribución plaquetario
	Ancho de distribución Eritrocitaria (ADE)	
	Recuento de <u>Reticulocitos</u>	
	% de <u>Reticulocitos</u>	

Valores normales de hematíes, hemoglobina, hematócrito e índices corpusculares en el adulto

	Mujer	Hombre
Hematíes ($\times 10^{12}$ /L)	4,8 \pm 1,0	5,5 \pm 1,0
Hemoglobina (g/dL)	14 \pm 2	16 \pm 2
Hematocrito (%)	42 \pm 5	47 \pm 6
Volumen corpuscular medio (VCM) (fL)	90 \pm 7	90 \pm 7
Hemoglobina corpuscular media (HCM) (pg)	29 \pm 2	29 \pm 2
Concentración corpuscular media de hemoglobina (CCMH) (g/L)	340 \pm 2	340 \pm 2
Amplitud de distribución eritrocitaria (RDW) (%)	12 \pm 2	12 \pm 2

Valores normales de leucocitos y fórmula leucocitaria

	%	Promedio (x 10 ⁹ /L)	Mínimo (x 10 ⁹ /L)	Máximo (x 10 ⁹ /L)
Leucocitos	-	7,5	4,5	11,5
Neutrófilos segmentados	55-70	4,8	2,5	7,5
Neutrófilos no segmentados	0,2-6	0,015	0,01	0,02
Eosinófilos	1-4	0,28	0,06	0,5
Basófilos	0,2-1,2	0,08	0,01	0,15
Linfocitos	17-45	3	1,3	4
Monocitos	2-8	0,5	0,15	0,9