

11221



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

THE AMERICAN BRITISH COWDRAY HOSPITAL

EVALUACION DEL CONTEO DIFERENCIAL  
AUTOMATIZADO  
POR EL COULTER JR.

FALLA DE ORIGEN

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
ESPECIALIDAD DE PATOLOGO CLINICO  
P R E S E N T A:  
DR. MARIO RAMON MORENO PACHECO

HOSPITAL  
ABC

ASESOR DE TESIS: DR. ARTURO MANLIO TERRES SPEZIALE



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## I N D I C E   G E N E R A L

	Pag.
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVOS	6
III. MATERIAL Y METODO	7
IV. DIAGRAMA DE ESTUDIO	9
V. DEFINICIONES	10
VI. RESULTADOS	11
VII. DISCUSION	19
VIII. BIBLIOGRAFIA	21

## INTRODUCCION

En el Laboratorio Clínico del Hospital A.B.C. , al realizar el trabajo de rutina en la sección de Hematología , observamos algunas diferencias entre los resultados de la cuenta diferencial de los Glóbulos Blancos ( GB ) obtenidos por el Analizador Coulter Jr. en forma automatizada y los que fueron contados en forma manual en el microscopio . Ante esta observación decidimos cuantificar este fenómeno para evaluar su magnitud y posible trascendencia clínica . Para esto diseñamos un protocolo de investigación prospectiva en el que se realizaron determinaciones en paralelo de la técnica automatizada vs. el metodo manual durante la rutina de trabajo de nuestro Departamento .

La cuenta diferencial de los leucocitos es parte fundamental de la Biometría Hemática ( BH ) , la que en procedimientos manuales consiste en la realización de una extensión sanguínea ( frotis ) en un porta o cubreobjetos . este es sometido a una tinción de Romanowsky , habitualmente con colorante de Wright el cual después es revisado visualmente en un microscopio contando por lo menos 100 células con un ocular de 10 x y un objetivo de 100 x .

La cuenta diferencial manual tradicional de los glóbulos blancos ha recibido recientemente muchas críticas debido a su alto costo , imprecisión ( poca reproducibilidad ) por variabilidad inherente y baja sensibilidad sobre todo cuando se utiliza como prueba de escrutinio .

Los clínicos frecuentemente repiten las cuentas diferenciales en los pacientes hospitalizados, esto da una información limitada a muy alto costo (particularmente en cuanto a consumo de tiempo vs información obtenida). Los contadores automáticos en cambio analizan un gran número de células ofreciendo mayor precisión, velocidad y menor costo que el conteo diferencial manual. (1).

Los primeros equipos automatizados se basaban en el reconocimiento de células teñidas sobre un frotis, sin embargo su costo era muy alto y solo se utilizaron en laboratorios donde se realizan gran número de cuentas diferenciales (1, 2). Al ser comparados con los equipos más recientes de citometría de flujo se encontró que ambos no identifican células anormales y que informan un diferencial de escrutinio desplegando varias señales o banderas en las muestras que deben revisarse al microscopio (4) Por otra parte la velocidad y la reproducibilidad es mejor en los equipos de citometría que en los de lectura automatizada de los frotis.

Los contadores Coulter para determinar el número de leucocitos se basan en el "Principio Coulter".

Principio Coulter : Las células que atraviesan una apertura por la cual está pasando una corriente, provocan cambios en la resistencia eléctrica que se registran como impulsos eléctricos.(6).

El Coulter Jr. al igual que otros instrumentos Coulter de la serie S, se basan para la cuenta diferencial en el

análisis de los volúmenes de los leucocitos , los eritrocitos son lisados con un reactivo lisante débil , este reactivo permite que los leucocitos queden íntegros pero con su citoplasma contraído .los linfocitos se reducen a un medio de su volumen original , mientras que los granulocitos debido a sus gránulos citoplasmicos se contraen a dos terceras partes de su volumen inicial, los monocitos y otras células mononucleares se reducen a un volumen que está entre los linfocitos y los granulocitos (4).

Pierre (1) ha determinado que los basófilos también se ubican en el área de los mononucleares .

TABLA 1.

CLASIFICACION DE LOS LEUCOCITOS DE ACUERDO A SUS VOLUMENES  
APROXIMADOS

TIPO DE CELULA	VOLUMEN (fl)	CLASIFICACION
Normoblastos	30 - 70	Linfocito
Linfocitos	35 - 90	Linfocito
Monocitos	80 - 180	Mononuclear
Eosinófilos	80 - 120	Mononuclear o Granulocito
Basófilos	80 - 180	Mononuclear
Neutrof. Segment.	> 120	Granulocito
Neutrof. Banda	> 120	Granulocito
Metamielocitos	> 120	Granulocito
Mielocitos	100-300	Granulocito ?
Blastos	50 -350	Variable



TABLA 2 .

VALORES DE REFERENCIA DEL NUMERO DE LEUCOCITOS  
Y DEL CONTEO DIFERENCIAL

Celula	%	ALVAR L.*		BAIN BJ.	
		No./mm <sup>3</sup>	No./mm <sup>3</sup>	No./mm <sup>3</sup>	No./mm <sup>3</sup>
Leucocitos	100	4000 - 10 900	4000 - 11 000		
Linfocitos	12-46	480 - 5 014	1000 - 4 000		
Monocitos	1-13	40 - 1 417	0 - 800		
Eosinófilos	0- 7	0 - 763	0 - 600		
Basófilos	0- 3	0 - 327	0 - 200		
Segmentados	40-76	1600 - 8 284	2000 - 8 000		
Bandas	0-11	0 - 1 199	0 - 1 000		

ALVAR L. Rev.Inv.Clin.(Mex),1963;15:43. (\* modificado)

Bain BJ,:England J.M. 1975;1: 306-309.

Moreno Pacheco Mario R.

**OBJETIVOS**

- 1.- Establecer la correlación de la cuenta diferencial en el Coulter Jr. con la cuenta diferencial manual.
- 2.- Establecer la sensibilidad y especificidad del Coulter Jr. para detectar granulocitos inmaduros y eosinofilos.

## MATERIAL Y METODOS

Prospectivamente estudiamos un total de 150 personas en tres grupos , que incluyeron a 50 pacientes hospitalizados , 50 pacientes ambulatorios y 50 individuos aparentemente sanos que acudieron al Departamento de Medicina Preventiva . Obtuvimos muestras de sangre venosa en tubos Vacutainer que contenian (K 3 EDTA)

Estudiamos un promedio de 10 muestras cada día , durante 3 semanas. Todas fueron analizadas en una primera etapa en un Coulter Jr. el cual se mantuvo en control de acuerdo a las indicaciones del fabricante con verificaciones diarias de calidad , con sangres control en niveles alto , normal y bajo ( 4c Plus Tri Pack - Coulter ) .

El tiempo transcurrido entre la toma de la muestra y la realizacion del estudio fue entre 1 y 4 horas , tiempo durante el cual las muestras permanecieron a temperatura ambiente .

Realizamos frotis sanguíneos de cada una de las muestras durante el dia de trabajo los cuales fueron analizados por un Patólogo Clínico Certificado por el Consejo Medico de Patología Clínica (\*) el cual desconocía los resultados obtenidos en el Coulter Jr. y solo tenía la información de la serie roja y la cifra absoluta de los leucocitos obtenida en el contador Coulter Counter S plus , el cual fue controlado en forma simultanea al Coulter Jr .(Diagrama de estudio).

(\*).- Dr. Arturo M. Terrés S.

Al terminar de contar las 130 muestras por el método manual y el automatizado , comparamos los resultados obtenidos por medio de una computadora personal Apple II E con un programa automatizado de bioestadística ( Daisy , K.C.Million 1981 ) cuando encontramos una diferencia entre el conteo manual y el obtenido por el Coulter Jr. de mas de 2 D.S. ( límite de Rumke ref. 5 ) contamos nuevamente el diferencial a 100 células e incluimos los datos para el análisis estadístico .

En el programa automatizado de estadística analizamos las medidas de tendencia central y de dispersión ( media , D.S. , C.V. ) además de las pruebas de correlación para variables continuas ( r ) y las pruebas de diferencia intragrupal ( t ) . Determinamos la significancia estadística en un nivel igual o menor a 0.05 en Glóbulos Blancos (GB) , Granulocitos (GR) , Linfocitos (L) y Monocitos (M) . Finalmente aplicamos el Teorema de Bayes (6) (3) para evaluar los resultados de Granulocitos Inmaduros (GI) , Eosinófilos (E) , Blastos (B) y Linfocitos Atípicos (LA) . Aplicamos Curvas de Operación Relativa (COR) en diversos niveles de Granulocitos Inmaduros (GI) para determinar el nivel óptimo de Sensibilidad. ( TABLA 3 ).

DIAGRAMA DE ESTUDIO:

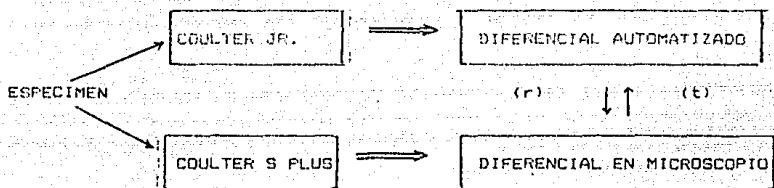


TABLA 3.

TEOREMA DE BAYES : DEFINICIONES

---

SENSIBILIDAD.--(S) Probabilidad de que el Coulter Jr. detecte la célula , en presencia de la célula en el frotis.

ESPECIFICIDAD.--(E) Probabilidad de que el Coulter Jr. no detecte la célula en ausencia de la célula en el frotis.

VALOR PREDICTIVO POSITIVO.--(VPP) Probabilidad de que exista la célula en el frotis en presencia de detección en el Coulter Jr.

VALOR PREDICTIVO NEGATIVO.--(VPN) Probabilidad de que no exista la célula en el frotis en ausencia de detección en el Coulter Jr.

INDICE DE FALSA POSITIVAS.--(IFP) Porcentaje de detección en el Coulter Jr. en ausencia de células en el frotis.

INDICE DE FALSAS NEGATIVAS.--(IFN) Porcentaje de no detección en el Coulter Jr. en presencia de células en el frotis.

POTENCIA DIAGNOSTICA.--(PD) Porcentaje de aciertos positivos y negativos.

---

## RESULTADOS

En muestras estudiadas en el Coulter Jr. el aparato presentó una señal (bandera) debido a sospecha de células anómalas en la cuenta diferencial en 30 de las 150 muestras estudiadas (20 %).

De las cuales 20 fueron Pacientes Hospitalizados , 8 Pacientes Ambulatorios y 2 de Medicina Preventiva.

En la tabla 4 , 5 , 6 se presentan los resultados de las medidas de tendencia central y dispersión además de las correlaciones ( $r$ ) y comparaciones intragrupalas ( $t$ ) de los tres grupos :

- 1.- Pacientes Hospitalizados : Notese que la correlación que existe en las cuentas de Granulocitos y Linfocitos son satisfactorias ( $r = 0.928$  y  $0.95$ ) mientras que existen diferencias significativas en los monocitos ( $p < 0.005$ ) [ Tabla 4 ]
- 2.- Pacientes Ambulatorios : En este grupo también hay buena correlación en Granulocitos y Linfocitos ( $r = 0.91$  y  $0.874$ ) con diferencias importantes en la cuenta de Monocitos ( $p < 0.05$ ) ( Tabla 5).
- 3.- Medicina Preventiva : Al igual que en los grupos 1 y 2 la correlación es buena en Granulocitos y Linfocitos ( $r = 0.843$  y  $0.833$ ) pero mala en los Monocitos ( $p < 0.001$ ) [ Tabla 6 ]

TABLA 4.

EVALUACION ESTADISTICA DE LA CUENTA DIFERENCIAL DE COULTER JR. VS. MANUAL, PACIENTES HOSPITALIZADOS

	GR. JR.	GR. M.	L. JR.	L. M.	M. JR.	M.M
MEDIA	79	77.7	15.3	19.1	5.5	2.96
D.S.	13.7	14.4	12.9	14	2.4	2.9
C.V.	17.3	18.5	84	73	43.6	97.9
V. MIN.	19	18	2	1	0	0
V. MAX.	97	98	75	81	13	14
CORRELACION	0.928		0.950		0.191	
T	0.462		1.39		4.81	
P	0.35 (N.S.)		0.10 (N.S.)		< 0.005	

TABLA 5.  
PACIENTES AMBULATORIOS

	GR. JR.	GR. M.	L. JR.	L. M.	M. JR.	M.M
MEDIA	58.4	56.9	34.9	38.7	6.6	4.56
D.S.	13.9	14.9	13.1	13.2	3.1	4.1
C.V.	23.8	26.1	37.5	34.1	46.9	89.9
V. MIN.	9	10	13	18	2	0
V. MAX.	81	80	83	70	23	20
CORRELACION	0.910		0.876		0.520	
T	0.519		1.42		2.84	
P	0.30 (N.S.)		0.10 (N.S.)		< 0.05	



TABLA 6.  
 PACIENTES DE MEDICINA PREVENTIVA

	GR. JR.	GR. M.	L. JR.	L. M.	M. JR.	M. M.
MEDIA	60.5	60.0	33.2	34.8	6.3	5.26
D.S.	8.5	9.8	8.2	9.2	2.0	2.4
C.V.	14.0	16.3	24.7	26.3	31.7	45.6
V. MIN.	42	32	13	12	3	0
V. MAX.	83	86	54	60	15	11
CORRELACION	0.843		0.833		0.424	
T	0.270		0.948		2.33	
P	0.40 (N.S.)		0.10 (N.S.)		< 0.01	

GR. = GRANULOCITOS  
 L. = LINFOCITOS  
 M. = MONOCITOS

JR. = COULTER JR.  
 M. = DIFERENCIAL MANUAL

TABLA 7

## GRANULOCITOS INMADUROS &gt; 1000/MM3

	INTERNOS	EXTERNOS	M.PREV.	PROMEDIO
VPN *	97	100	100	99
S	80	100	100	93
IFP	79	80	50	70
E	67	92	98	86
VPP	21	20	50	30
IFN	3	0	0	1
PD	68	92	98	86

TABLA 8..

## EOSINOFILOS &gt; 700 / MM3

	INTERNOS	EXTERNOS	M.PREV.	PROMEDIO
VPN *	100	100	100	100
S	100	100	100	100
E	65	92	98	85
IFP	94	80	50	75
VPP	6	20	50	25
IFN	0	0	0	0
PD	66	92	98	85

TABLA 9.

## LINFOCITOS ATIPICOS

	INTERNOS	EXTERNOS	M.PREV.	PROMEDIO
VPN *	95	100	100	98
E	57	90	98	82
S	33	100	100	78
IFP	85	83	50	27
VPP	14	16	50	27
IFN	5	0	0	2
PD	84	90	98	91

TABLA 10.  
BLASTOS

	INTERNOS	EXTERNOS	M.PREV.	PROMEDIO
VPN *	98	100	100	99
E	93	92	98	94
S	67	100	100	89
IFP	60	80	50	63
VPP	40	20	50	37
IFN	2	0	0	1
PD	92	98	98	96

TABLA 11.  
EVALUACION GLOBAL DE LAS VARIABLES

	EOS	G1	LA	BLAST	RESULTADO
VPN *	100	99	98	99	99
S	100	93	78	89	90
E	85	96	82	94	89
IFP	75	70	73	63	70
VPP	25	30	27	37	30
IFN	0	1	2	1	1
PD	85	86	91	96	90

\* VER DEFINICIONES EN TABLA 3.

En las tablas 7 , 8 , 9 , 10 y 11 presentamos los resultados que encontramos al a utilizar el Teorema de Bayes para conocer la posibilidades diagnósticas de las diversas variables estudiadas en el diferencial automatizado .

- Granulocitos Inmaduros : Tabla 7 . Su principal cualidad se relaciona al valor predictivo negativo ( VPN = 99 % ) que como se recordará es la probabilidad de que no existan células inmaduras en la microscopía del frotis en ausencia de detección en el Coulter Jr.

- El valor de corte para granulocitos se obtuvo de la Curva de Operación Relativa , ya que el aparato no tiene asignado un valor determinado para desplegar la bandera de sospecha.

En la Tabla 12 mostramos la evaluación de las Curvas de Operación Relativa , resultante de modificar el " valor de corte " de los granulocitos inmaduros en números absolutos desde  $> 400$  hasta  $> 1000 / \text{mm}^3$ . Notese que al aplicar el criterio en  $> 1000 / \text{mm}^3$ , se logra la máxima sensibilidad ( 90 % ) , el mejor VPN (97%) y un IFN de (3%).

- Eosinofilos : Tabla 8 con un valor de corte de  $700 / \text{mm}^3$ , establecido por el Coulter Jr. donde su principal característica es el VPN con 100 % , así como una Sensibilidad del 100 %.

- Linfocitos Atípicos: Tabla 9 .al igual que para la tabla 8 su mejor característica esta en el VPN además de tener una sensibilidad del 78 %.

Elastos: Tabla 10 . Su cualidad mas util tambien radica en el VPN con 99% en promedio.

Moreno Pacheco Mario R.

TABLA 12. GRANULOCITOS INMADUROS: CURVA DE OPERACION RELATIVA.

PRUEBA	VALOR DE CORTE				No. / mm.3
	> 400	>500	>700	>1000	
S	60	60	75	80	
E	77	71	69	67	
VPP	63	47	31	21	
VPN	74	80	93	97	
IFP	36	52	68	78	
IFN	25	19	6	3	
PD	70	68	70	68	

## DISCUSION

Trabajos previos han evaluado contadores hematológicos semejantes ( Coulter Counter S. IV Dif. contra cuenta diferencial por procedimiento manual ) encontrando resultados similares a los nuestros. los cuales se pueden considerar como muy buenos en cuanto a granulocitos y linfocitos ( con correlaciones alrededor de 0,9 ) y pobre en la población de mononucleares ( correlaciones menores a 0,5 ) ( TABLAS 4 , 5 , 6 ).

Estas diferencias son explicables debido a que en el grupo de células mononucleares se incluyen a otras líneas celulares que no son posibles diferenciar como una población aparte mediante esta metodología.

v.gr: algunos eosinófilos , basófilos , linfocitos grandes o atípicos etc.

En la curva de operación relativa aplicada a la evaluación de los granulocitos inmaduros encontramos que con un valor de corte de mas de 1000 / mm<sup>3</sup>. existe un índice de falsas positivas del 78 % , al obligarnos esto a realizar un conteo manual no puede considerarse como un defecto siendo inclusive en nuestra opinión un acierto . Lo que si podría ser preocupante son los errores relacionados a los " falsos negativos " en los que aún cuando existen " bandas " en el diferencial no son detectadas por el Coulter Jr. siendo un problema pequeño al ocurrir en tan solo el 3 % de los casos y seguramente con minimas desviaciones " hacia la izquierda " .

Finalmente es nuestra opinión que los equipos Coulter con diferencial automatizado representan un avance significativo de la Tecnología ya que permiten incrementar el numero de casos estudiados por día y por

Moreno Pacheco Mario R.

operario en forma importante, facilitando la clasificación de los individuos sanos cuyo estudio no requiere de un conteo diferencial microscópico además de llevarse a cabo en forma rápida la detección de aquellos pacientes que requieran de un estudio cuidadoso el cual es orientado adecuadamente en forma preliminar por el equipo que al contar con "banderas" o señales específicas de anormalidades existentes ayuda al microscopista a realizar un diagnóstico más certero.

En base a nuestros resultados y a nuestra experiencia no se debe pensar que estos equipos pueden llegar a sustituir al examen microscópico de los extendidos de sangre periférica. Debemos considerarlos como una herramienta valiosa que facilita la aplicabilidad de los recursos y optimiza la confiabilidad de los resultados.

Creemos que cada laboratorio que adquiera este tipo de instrumentos debe llevar a cabo un estudio semejante en el cual pueda ubicar criterios específicos para el tipo de paciente que atiendan: Hospitalizados o externos, agudos o crónicos, adultos o pediátricos, etc.



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

- 1.- Griswold D.J. , Champagne V.D. : Evaluation of the Coulter S-Plus IV three-part differential in acute care hospital. Am.J.Clin.Pathol.1985; 84:49 - 57..
- 2.-Cordova Ma. Soledad. , Galvan Isabel.: Evaluacion del Diferencial de los Leucocitos efectuado en un equipo STKR de Coulter . Rev.Inst.Nal. Nutric.Salvador Zurviran. 1989;1:1 Jul-Agost.29 - 32..
- 3.- Terrés Speziale A. : Interpretacion de estudios de laboratorio (Teorema de Bayes) . Noti-Lab. Hospital A.B.C. 1989 ; VIII , No.6 .
- 4.- Cornbleet Joanne.,Kessinger Sally.:Evaluation of Coulter S-Plus Three-part Differential in Population with a High Prevalence of Abnormalities. Am.J.Clin.Pathol.1985;84:620 - 626.
- 5.- Rumke C.L.:The statistically expected variability in differential leucocyte counting,Differential leucocyte counting. Edited by Koepke J. Aspen,College of American Pathologists,1977, 39 - 45.
- 6.- Todd , Sanford , Davidsohn , Henry:Clinical diagnosis and management by laboratory methods , 16a. edicion, Philadelphia U.S.A. , W.B. Saunders Co. 1979; pp. 868 -869 y 532 -540.
- 7.- Negrete J:Popper Vs Bayes Vs. Hempel: Un dialogo entre robots. Instituto de Investigaciones Biomedicas Biomatemáticas. UNAM Mexico 1984; pp 128.