

86
201.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CUENTA DIFERENCIAL
AUTOMATIZADA**

TRABAJO ESCRITO

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

P R E S E N T A .

MARIA ELENA MARTINEZ GARCIA

MEXICO, D. F.

1993

**TESIS CON
FALSA DE ORIGEN**



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.

CONTENIDO

	Págs.
Dedicatorias	
INTRODUCCION.....	I
OBJETIVO.....	III
GENERALIDADES.....	1
ANTECEDENTES.....	4
INSTRUMENTOS HEMATOLOGICOS	
1.- a) Modelo QBC.....	11
b) Modelo DIFF 3.....	14
c) Modelo HEMALOG D.....	17
d) Modelo H-1.....	21
e) Modelo CELL-DYN 3000	24
f) Modelo STKS.....	28
2.- Características de los Instrumentos Hematológicos.....	39
3.- Pruebas de Concordancia.....	40
4.- Desventajas de los Instrumentos Hematológicos.....	55
DISCUSION.....	58
CONCLUSION.....	58
BIBLIOGRAFIA.....	60

Una vez más te agradezco Señor,
hiciste que te reconociera.

*' Cosa tus momentos presentes,
quizás mañana te aguarden
largas jornadas de dolor '*

A ti papá, a ti mamá:

' Que todos aquellos sacrificios,
de ahora en adelante, funcionen
como el más sólido cimiento '

A mi Tio Nemo:

***Me brindaste tu apoyo y dedicación,
de otra forma no lo hubiera logrado.***

Con admiración María Elena.

En especial a una persona que cambió
la dirección de mi vida, sembró en mi
seguridad y confianza, siempre
demostrando que un ser digno lo que
busca es la superación de cada día.

Te amo Poli.

No quisiera cometer el error de omitir a muchas personas que de alguna forma se involucraron en mi vida, o anotar sólo unas cuantas siendo que cada una de ellas participaron. Trato, por ello, de agradecerles a todas y darles las gracias.

Gracias por todo.

INTRODUCCION

Antes de que se utilizaran instrumentos automatizados, la mayoría de las determinaciones hechas por el laboratorio de hematología eran: concentración de hemoglobina, hematocrito, el conteo de células blancas y evaluaciones cualitativas y cuantitativas de frotis sanguíneos. Menos frecuente era el conteo de glóbulos rojos, reticulocitos, plaquetas e índices celulares.

De entre esas medidas, únicamente las determinaciones de hemoglobina y hematocrito pueden ser hechas sencilla y rápidamente por técnicas manuales. Sin embargo la utilidad de estas determinaciones se afecta por los errores que se cometen, es una labor tediosa y cara, y se le asocia un bajo grado de precisión y una exactitud que no es uniforme.

La cantidad de células analizadas por el método manual es de 100 a 200; así, los problemas prácticos asociados con la necesidad de obtener resultados satisfactorios, ha motivado el desarrollo de técnicas automatizadas, que eliminan muchas fuentes de error que ocurren con el diferencial manual. Lo que asegura también la obtención de resultados rápidos y mejoras en el aspecto económico.

De los adelantos técnicos propuestos, dos han sido desarrollados en un nivel aceptable: un procesador de imágenes digital y uno de flujo citoquímico. El primero ofrece un grado de automatización y una cuenta estadística

bajos, por lo que su uso queda limitado.

En cuanto al segundo, el analizador de flujo citotímico, es el que clasifica a los leucocitos de acuerdo a su complejidad, tamaño y actividad de la mieloperoxidasa. Desde hace quince años, estos analizadores están disponibles comercialmente y su utilidad ya ha sido bien establecida.

Un sistema diferencial automático debe ser capaz de identificar las células normales de las anormales, de ahí que sea necesario establecer un criterio y delimitar la especificidad de un método, lo cual es el objetivo del presente trabajo.

OBJETIVO:

Investigar cuál es el equipo automatizado empleado en el laboratorio de Hematología y el más adecuado para nuestro medio, con el fin de valorar las ventajas y desventajas de los ya existentes en el mercado.

GENERALIDADES

La hematología es el estudio de la sangre desde el punto de vista de su composición química, estructura histológica, fisiología y patología. De ahí que la sangre sea de vital importancia para un organismo. Esta rama incluye el estudio de:

- la concentración de los diferentes tipos de células en la sangre;
- el estado y comportamiento proliferativo de sus precursores en los órganos hematopoyéticos;
- la estructura, contenido químico y actividad funcional de las células sanguíneas; y
- el papel de los vasos sanguíneos, función plaquetaria y coagulación sanguínea en el mantenimiento de la integridad vascular.

Las alteraciones que se producen en relación con estas características pueden dar origen a enfermedades hematológicas o representar las manifestaciones hematológicas de enfermedades que se inician en otras partes del cuerpo.

Por ello, es necesario que todos los métodos hematológicos que normalmente se utilizan en el estudio de enfermedades mejoren. En Hematología, dentro de estos estudios, está la biometría hemática, que se encarga del estudio de los elementos formes de la sangre. Dicho estudio

se divide en dos partes:

- a) fórmula roja
- b) fórmula blanca

La fórmula roja incluye: la cuantificación de hemoglobina, determinación del número de eritrocitos; el valor del hematocrito y los índices hematológicos (concentración media de hemoglobina corpuscular, CMHC; hemoglobina corpuscular media, HCM; y volumen corpuscular medio VCM).

En cuanto a la fórmula blanca comprende el conteo de los leucocitos totales y su diferencial.

El presente trabajo pretende enfocarse a éste último punto mencionado (cuenta diferencial de leucocitos) no como una cuenta celular normal, sino como parte de un proceso automatizado.

La cuenta diferencial automatizada ofrece mayor utilidad en cualquier laboratorio clínico, comparada con la técnica manual. La primera ofrece mayores requerimientos de reproducibilidad, de exactitud y precisión, además de la pronta obtención de resultados, sobre todo si son de carácter urgente y cuando la carga de trabajo es grande.

Una vez obtenidos los resultados se podrá descartar a aquellos que no ameriten una revisión manual y dedicar mayor atención a aquellos en donde se presente alguna anormalidad.

A lo largo de este trabajo se describen las características de cada uno de los equipos automatizados; se

establecen sus condiciones de operatividad, de tal manera que podamos contribuir a la selección del equipo más adecuado a nuestro medio, reduzcamos el consumo de tiempo y mejoremos la calidad en resultados de análisis practicados.

No cabe descartar, aún así, que seguirá existiendo discrepancias en el criterio de cada analista con respecto a si es aconsejable o no, el uso de aparatos que realicen cuentas diferenciales, o bien seguir ofreciendo resultados a partir del trabajo puramente manual.

ANTECEDENTES

Aunque los instrumentos automatizados en el laboratorio de Hematología son capaces de reportar multiparámetros esta revisión únicamente tratará la cuenta diferencial automatizada.

Para manejar un patrón de comparación se hizo necesario considerar al método manual de conteo celular diferencial, en donde se parte de la preparación de un frotis sanguíneo.

Frotis sanguíneo

Al preparar una muestra de sangre para microscopía, se extiende primero una gota pequeña sobre la laminilla de vidrio y se seca. Después de lo cual, se fijan las células y se tiñen. Se emplea metanol como fijador, seguido de tinción con uno de los colorantes de Romanowsky.

Estas tinciones se preparan a partir de mezclas de azul de metileno y eosina por métodos que involucran la producción de colorantes púrpura (azur), que son producto de la oxidación del azul de metileno. El colorante Wright es el más empleado en ciertos laboratorios.

Los resultados obtenidos con cada uno de estos colorantes generalmente son semejantes, pero puede haber una leve variación según los diferentes tipos de tinción, pH del amortiguador usado en la dilución y espesor del frotis.

Las estructuras que se tiñen en color rojo se denominan

acidófilas y probablemente tengan reacción alcalina: las que se tiñen de color azul son basófilas y en general dan una reacción ácida. Pueden observarse todos los tonos entre el rojo y el azul. Las estructuras que se tiñen de color púrpura se llaman azurófilas y se observan mejor después de la tinción con Giemsa.

Examen del frotis sanguíneo

Debe examinarse primero con el objetivo de baja resolución del microscopio, para observar si está teñido adecuadamente. Se evalúa el número relativo de eritrocitos y de leucocitos y se escoge una zona adecuadamente para el examen con el objetivo de mayor resolución. A menudo se requiere la observación con inmersión en aceite para ver los detalles más finos de las células.

De esta manera distinguimos a eritrocitos, leucocitos y plaquetas.

Eritrocitos

Son células que se tiñen de color rojo, pero su centro está teñido con menor densidad a la periferia, fig.1.

Esto es debido a que el eritrocito es un disco



Fig. 1.

bicóncavo y es más delgado al centro que en los bordes. En los eritrocitos jóvenes, el citoplasma tiene un tono azulado debido al ácido ribonucleico. Tales células se llaman policrómicas.

Leucocitos

Se dividen en tres grupos: granulocitos, linfocitos y monocitos, por su aspecto en el frotis teñido. Los granulocitos a su vez se subdividen en tres tipos: neutrófilos, eosinófilos y basófilos, dependiendo de la naturaleza de los gránulos en su citoplasma.

Neutrófilos

Por lo general son los leucocitos que se observan con mayor frecuencia en los frotis de sangre normal de los adultos, fig.2. El núcleo se tiñe de color violeta intenso, y se tienen diversas formas, dando lugar al nombre de leucocito neutrófilo polimorfonuclear.



Fig. 2.

El citoplasma de los neutrófilos se tiñe de color rosa pálido y contiene gránulos que adquieren una coloración de rojo a violeta, por lo general son pequeños pero varían de tamaño y número.

Eosinófilos

Generalmente se parecen a los neutrófilos; pero son algo mayores. El núcleo contiene dos lóbulos y el citoplasma está apretujado con gránulos relativamente grandes de color rojizo parduzco, fig. 3.



Fig. 3.

Basófilos

En términos generales se parecen a los neutrófilos. El núcleo está semioculto por grandes gránulos de color violeta que llenan el citoplasma, fig. 4.



Fig. 4.

Linfocitos

Son los leucocitos más pequeños de la sangre, a veces se distinguen dos tipos: el pequeño y el grande, fig. 5. El núcleo está redondeado con muescas leves y llena el mayor espacio de la célula. El material



Fig. 5.

nuclear está arreglado en masas densas que se tiñen de un color púrpura muy intenso. El citoplasma tiene un color azul claro y algunas veces contiene gránulos azurófilos.

Monocitos

Son los leucocitos de mayor tamaño en la sangre.

El núcleo tiene algunas muescas, pero puede tener otras formas, fig. 6.

Posee una red cromática abierta y adquiere un color púrpura claro. El citoplasma

es de color grisáceo y difuso por lo general, contiene pocos gránulos. A menudo la célula tiene forma irregular.



Fig. 6.

Plaquetas

Las plaquetas se observan en frotis teñidos como células pequeñas, sin núcleo y de una forma redonda y oval, fig. 7.

A menudo se encuentran racimos de trombocitos en los frotis de sangre.



Fig. 7.

A este procedimiento, de examinar un frotis sanguíneo se le conoce con el nombre de Hemograma de Shilling.

En el laboratorio de Hematología, la cuenta diferencial de leucocitos es uno de los procesos más laboriosos y consumidores de tiempo; que como ya se mencionó, éste análisis está sujeto a varios errores entre los que encontramos:

- inadecuada agitación de las muestras
- mantenimiento de las muestras en tubos abiertos durante horas
- número de células contadas limitada a 100 o 200 por frotis sanguíneo
- carga de trabajo elevada y por tanto disminución en la productividad del contador análista
- tiempo de análisis por frotis sanguíneo mayor
- costos elevados, etc.

Con este objetivo, al igual que en muchos otros laboratorios, se hace indispensable ciertos conceptos estadísticos. En el caso de la cuenta diferencial automatizada y en particular cuando se realizan pruebas de concordancia entre diversos aparatos es menester establecer normas satisfactorias, por ejemplo: que los resultados obtenidos estén dentro de unos límites establecidos, tales como ± 2 desviación estándar.

σ , es el símbolo con que se representa la desviación estándar, y nos indica la medida de la dispersión de los valores.

La fórmula matemática para calcular la σ de una serie de valores es:

$$\sigma = \sqrt{\frac{L(100 - L)}{N}}$$

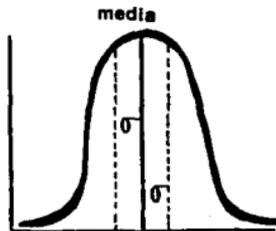
donde:

σ = desviación estándar
 N = no. de células contadas
 L = tipo celular

La distribución de los valores corrientemente tiende a seguir una curva teórica conocida como gaussiana, fig. 8. Los diferentes valores encontrados se representan frente a la frecuencia de incidencia.

Curva Gaussiana.

frecuencia
relativa



unidades de
concentración

Fig. 8.

De esta manera los valores reportados tendrán un desplazamiento hacia la derecha o a la izquierda del valor promedio indicando con ello las tendencias en el funcionamiento y resultados de los aparatos automatizados.

De ahí que, diferentes compañías se preocupen por

mejorar o inventar nuevas tecnologías que permitan realizar la cuenta diferencial eliminando el mayor número de errores, es decir, una cuenta diferencial precisa y exacta.

La aparición de estas tecnologías presenta un orden cronológico; para los instrumentos que se analizarán en este trabajo es aproximadamente el siguiente: QBC II, DIFF 3, HEMALOG D, H-1, CELL-DYN (CD 3000) y STKS, donde cada uno de ellos tiene principio de funcionamiento diferente.

A partir de este momento nuestra atención se enfocará hacia sus características.

Instrumentos Hematológicos que realizan una cuenta diferencial automatizada:

MODELO QBC II

Es un sistema hematológico centrífugo. En donde previamente, se obtiene la sangre en tubos capilares con anticoagulante (deshidratado), se cierra y se gira entre los dedos con el objeto de mezclar, posteriormente se centrifuga. Una vez que se detiene el sistema se hace una lectura/registro.

Su principio o funcionamiento está basado en un gradiente de densidad. De tal manera que se observan las siguientes capas o bandas.

Banda uno: Contaje de plaquetas

Las plaquetas teñidas se encuentran en la banda de menor densidad de la placa leucocitaria. El lector QBC controlado por un microprocesador convierte la longitud de esta onda en un valor numérico de plaquetas expresado como plaquetas (10^9 /L).

Banda dos: Contaje total y porcentaje de linfocitos/monocitos

Este segmento de la capa leucocitaria está compuesto por linfocitos y monocitos teñidos.

El lector QBC convierte la longitud de esta banda en un contaje total de linfocitos y monocitos, expresado como linfocito/monocito (10^9 /L). También se expresa como porcentaje del conteo total de células blancas expresado como porcentaje linfocito/monocito.

Banda tres: Contaje total y porcentaje de granulocitos

Los granulocitos contemplados en esta banda son neutrófilos, eosinófilos y basófilos. La banda es medida por el lector QBC y convertida en un contaje total de granulocitos que aparece como "granulocitos (10^9 /L)" y un porcentaje de la cuenta total de granulocitos que aparece como "% grans."

Banda cuatro: Contaje total de glóbulos blancos

El lector del QBC combina las medidas de los segmentos dos y tres y convierte la lectura en un contaje total

número de leucocitos que aparece como "cuenta de glóbulos blancos ($10^9/L$)".

Banda cinco: Hematocrito

Son dos bandas compuestas de glóbulos rojos aglomerados (la banda más clara se compone de las células que rodean el flotador QBC). El lector QBC las mide juntas, las convierte en una determinación del valor hematocrito y aparece como "hct (%)".

Para observar la disposición de las bandas ver la figura correspondiente, fig 9.

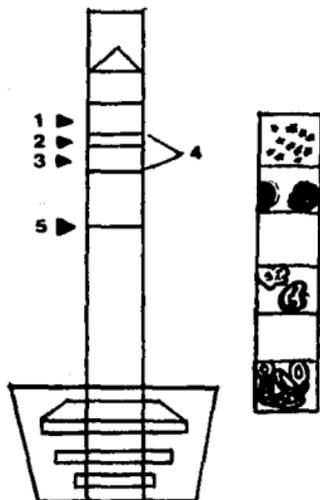


Fig. 9.

Bandas

1. Contaje de plaquetas
2. Contaje total y porcentaje de linfocitos/monocitos
3. Contaje total y porcentaje de granulocitos
4. Contaje total de glóbulos blancos
5. Hematocrito.

MODELO DIFF 3

Es un analizador automatizado de sangre manufacturado por Perkin-Elmer Corporation (cuyas ventas y servicios están asumidas por Coulter); consiste de tres componentes principales: un analizador, toma de muestra y un paquete con dilutores, mezclador y agentes tintoreales que conforman al instrumento teñidor Ames-Hema-Tek. El analizador es equipado con un microscopio de pantalla motorizada.

La imagen producida por el microscopio es dividida en tres partes. una va al detector celular, un arreglo de fotodiodos; otro a los objetivos del microscopio para la visualización del operador y una tercera a un sistema de video-cámara.

Después de que una célula ha sido aislada por el sistema fotodetector, ésta es examinada cuidadosamente por la video cámara a dos resoluciones y dos longitudes de onda (verde y amarilla-roja); la información derivada por ejemplo: tamaño, forma, textura, color, etc., es entonces digitalizada para procesarla por una computadora analizadora de imágenes.

Una pantalla de televisión sobre el analizador expone la imagen procesada por la cámara. De una cuenta de cien células, el reporte es imprimido automáticamente sobre una tarjeta.

Un sistema DIFF 3 fue evaluado por un periodo de cinco semanas en el laboratorio del Hospital New York Veterans, con

gran diversidad de población. Con este objeto se seleccionaron un total de 247 muestras, dentro de las cuales se incluyeron pacientes hematológicamente normales y anormales. Del total, un 20% de los especímenes fueron muestras repetidas de algunos pacientes traídas y analizadas en días diferentes.

Fueron comparados los datos reportados por analistas del Laboratorio y los obtenidos por el sistema DIFF 3. Encontrándose los siguientes resultados:

TABLA 1.

SEÑALES

	DIFF 3	LABORATORIO
Verdadero Positivo	35	37
Verdadero Negativo	155	190
Falso Positivo	35	2
Falso Negativo	20	18
Sensibilidad	54%	67%
Especificidad	81%	98%
Eficiencia	77%	82%
Total de muestras = 247		

La tabla 1 demuestra que la sensibilidad en las dos metodologías son comparables; sin embargo la especificidad y la eficiencia en el caso de la metodología del sistema DIFF 3 fue mucho menor por el alto número de resultados falsos positivos reportados.

Además no se debe pasar por desapercibido que este instrumento trabaja a partir de modelos de reconocimiento y que su memoria fue alimentada con tan solo 3300 imágenes. Cantidad irrisoria para el pleomorfismo celular existente, hecho que no permite encontrar células iguales.

Partiendo de estos resultados podemos establecer que la utilización de un equipo automatizado como el DIFF 3 es útil para trabajo de rutina, pero es indispensable la unificación de criterios que pueden ser aplicados a la evaluación de muestras de sangre periférica, de tal manera, que no se presenten discrepancias como la reportada en la ya citada tabla 1.

MODELO HEMALOG D

Es un instrumento automatizado hematológico señalado para dar información selectiva numérica y funcional con el propósito de facilitar el trabajo manual rutinario en los laboratorios de Hematología.

Su función está basado en el análisis de flujo continuo en combinación con técnicas citoquímicas y electro-ópticas. Clasifica 10 000 leucocitos en sangre total con anticoagulante (ácido etilendiaminotetracético, EDTA).

Se decide la clasificación de las células por tamaño y la intensidad de color, las células fluyen a través de detectores diseñados para medir la disminución de la intensidad del haz de luz y su dispersión, fig 10.

Los métodos químicos para la identificación celular son:

a) Para basófilos

Las propiedades fuertemente aniónicas de los gránulos basófilos son debidos a su gran contenido de heparina. La única característica de la heparina es la habilidad de retener tinta en presencia de cuaternarios, de este modo, el Azul de Alcian es uno de los colorantes más empleados por producir mayor contraste y un espectro de absorción marcado. Este identifica a los basófilos cuando se usa en presencia de sales cuaternarias de amonio y otros cuaternarios.

b) Eosinófilos y neutrófilos

Estas células contienen peroxidasas muy activas, las cuales son aún activas a un pH=2.0. Sin embargo, se establece que un pH=3.2 es suficiente para hacer una diferenciación entre ambas células mediante pulsos electrónicos.

En la reacción se utiliza una mezcla de peróxido de hidrógeno con 4-cloro-1-naftol además de formaldehído puesto que se desea la fijación controlada de las células a fin de asegurar la inmovilización intracelular de la enzima.

El producto de esta reacción es insoluble en agua y tiene un amplio espectro de absorción con buena extinción.

Los eosinófilos tienen una tinción de peroxidasa más intensa sin embargo existen algunos neutrófilos que también la presentan, pero se diferencian gracias a la dispersión de la luz.

c) Monocitos

Tienen una enzima esterasa inespecifica que es más activa que la de las células restantes, en presencia de α -naftilbutirato; una vez que este compuesto es hidrolizado por la enzima a ácido butírico y α -naftol, éste último es precipitado intracelularmente por acoplamiento con sales diazoadas.

Se agregan otros inhibidores para las esterases de neutrófilos y del plasma.

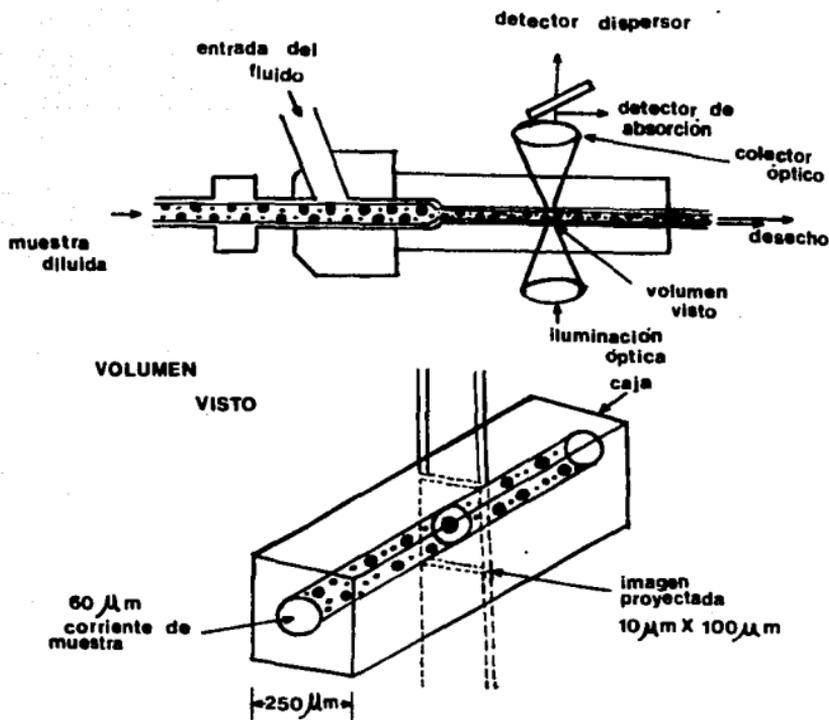


Fig.10 Diagrama de la función del flujo celular. Cada muestra es sujeta a un flujo celular. La corriente de muestra analizada es reducida a $60\ \mu\text{m}$ por cubierta. Un haz de luz es proyectado a través de la corriente de muestra. La entrada y salida de las ventanas son paralelas y planas.

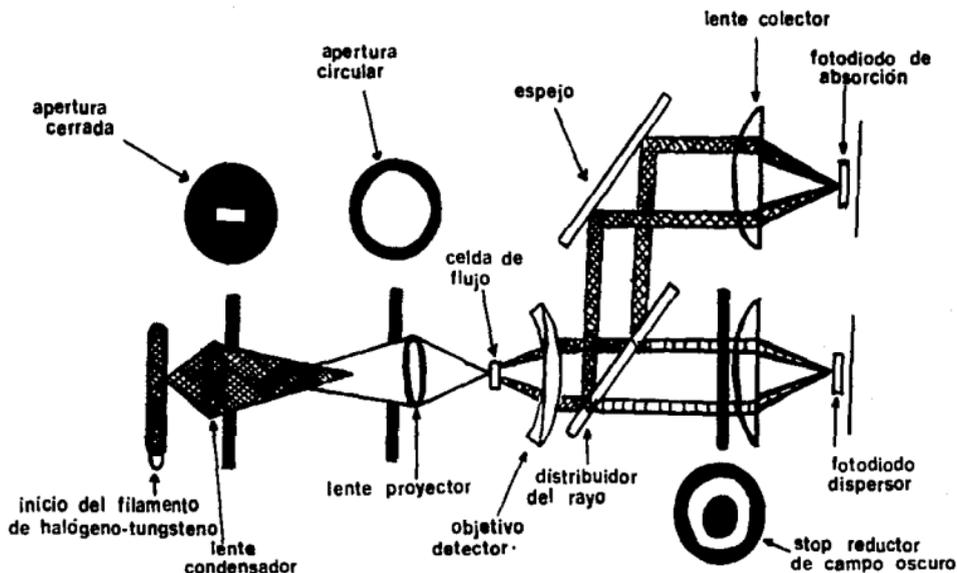


Fig. 11 Configuración óptica de un canal. Hay tres canales orientados alrededor de una fuente de luz común. Cada canal contiene el distribuidor del rayo, un stop reductor del rayo y filtros (no presentados), para igualar las características espectrales a las características celulares.

MODELO H-I

Es un contador de células sanguíneas automatizado que proporciona una cuenta completa sanguínea de ocho parámetros y una cuenta diferencial de leucocitos de seis tipos de células. Sus antecesores son el Hemalog D y el H 6000.

Determina sus diferenciales usando técnicas citoquímicas y de flujo. El sistema contiene tres módulos: uno analítico, un electrónico y una pantalla con módulo impresor. Consta de dos canales, el primero, el canal de peroxidasa (perox) y el segundo, el de basofilia/lobularidad (bl), respectivamente.

El canal de Perox clasifica los leucocitos basado en el tamaño y en la actividad de la mieloperoxidasa. Son determinados de este canal, la cuenta total de leucocitos, los porcentajes y los números absolutos de neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y células grandes no teñidas (células LUC). Si el porcentaje de células LUC es de 4% o más grande una señal atípica se registrará. Los basófilos no son clasificados a partir de este canal.

En la cámara de bl, los leucocitos y eritrocitos son lisados dejando únicamente núcleos desnudos con excepción de los basófilos, los cuales son los únicos resistentes a la lisis.

Con el uso de dos ángulos de luz dispersores, las subpoblaciones de leucocitos pueden ser identificados en base a la información dispersada de las células ya sea por su

tamaño y por su complejidad nuclear.

Todas las señales son registradas en un citograma. Los basófilos caen dentro del nivel medio alto del citograma y las células normales restantes dentro del nivel medio bajo.

En el nivel medio más bajo, la mayoría de estructuras o células lobuladas aparecen a la derecha y las menos estructuradas a la izquierda. Una computadora determina el radio entre el ancho del ángulo de las señales de luz dispersa para las células polimorfonucleares y la población mononuclear es reportada como índice de loburidad (il). Este es un índice de la segmentación de polimorfonucleares. Existe un umbral y cuando es rebasado una señal blástica es generada.

Los resultados de los dos canales son integrados y comparados, dando un diferencial numérico final.

En realidad, el índice de lobularidad es útil para detectar y señalar desviación hacia la izquierda en la distribución de leucocitos, leucocitos anormales, la presencia de formas blásticas, linfocitos transformados, granulocitos inmaduros y eritrocitos nucleados.

Un análisis de una muestra normal de sangre en un citograma es como el que a continuación se muestra: (fig. 12)

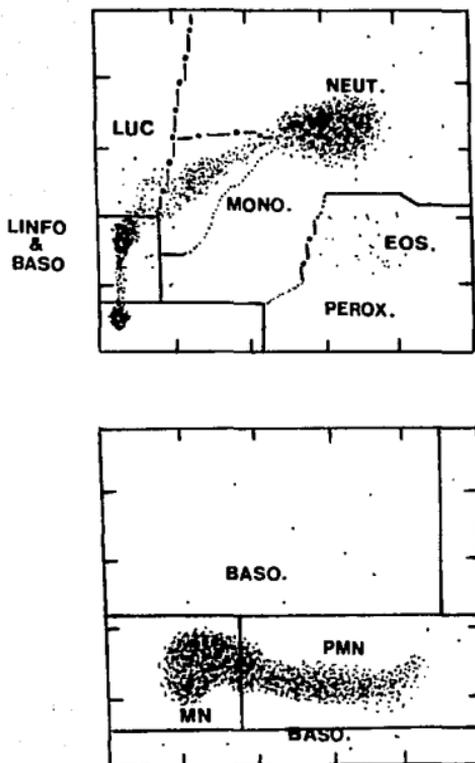


Fig. 12. Citograma de una muestra normal. El conteo diferencial incluye: neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos, células LUC (células grandes no coloreadas); Perox., peroxidasa; PMN, polimorfonucleares y MN, células mononucleares.

MODELO CELL-DYN (CD 3000)

Es un analizador hematológico que da una cuenta de cinco poblaciones de la cuenta diferencial de leucocitos, un diagrama de dispersión relativo a las poblaciones de leucocitos y una serie de señales morfológicas y distribucionales, además determina la cuenta de glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media, concentración media de hemoglobina corpuscular, ancho de distribución de las plaquetas, el volumen plaquetario medio, ancho de distribución de las células rojas y plaquetas.

Es un instrumento que necesita de agitación manual, cuenta con un mezclador de sangre a base de movimientos rotatorios, eliminando con ello la posible hemólisis y aspira muestras en tubo cerrado (tubo vacutainer).

La medición de las células blancas se basa en la dispersión de rayo láser multidimensional con una corriente de micromuestra enfocada hidrodinámicamente y un contador de flujo.

La tecnología de la dispersión del multiángulo polarizado y su separación junto con el perfil láser de gran alcance proporcionan las mediciones celulares. Cada leucocito es caracterizado por la dispersión de luz en cuatro dimensiones, fig. 13.

Posee una representación gráfica de los datos para todos los tipos celulares e imprime los resultados registrados.

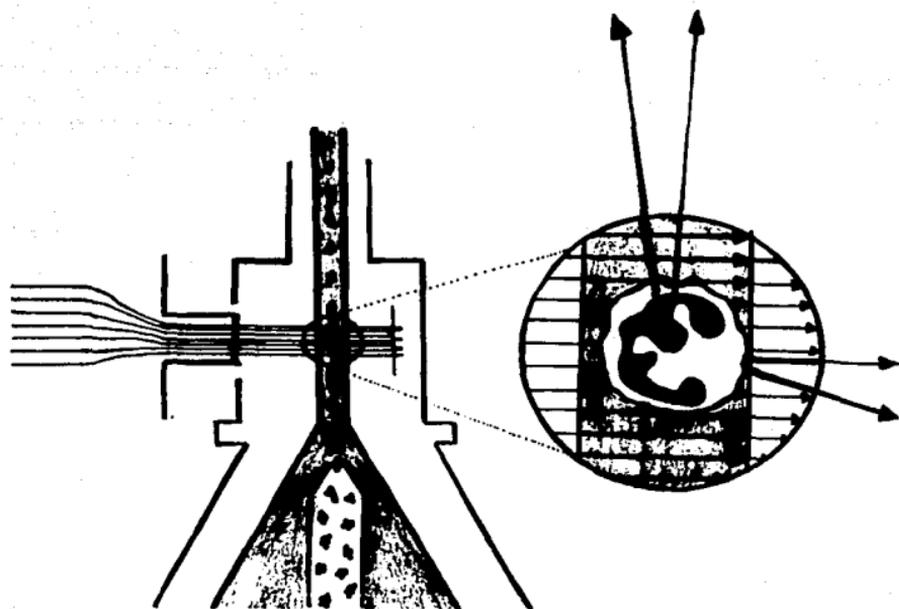


Fig. 13. El modelo CELL-DYN 3000 clasifica los leucocitos gracias a la dispersión del multiángulo polarizado. Cada célula es caracterizada en cuatro dimensiones.

Se anexa una hoja-reporte comúnmente expedida por el Laboratorio de Hematología para una muestra sanguínea.

En ella se observan los siguientes datos.- fecha, hora, versión del programa, datos del paciente, reporte de la fórmula blanca (tanto en porcentaje como en valores absolutos), fórmula roja, algunos otros parámetros y observaciones.

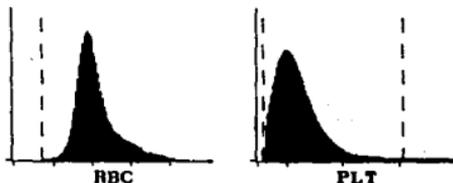
Los diagramas reportados corresponden a concentración de glóbulos rojos, plaquetas, dispersión de las células y su disposición de acuerdo a tamaño y complejidad.

Current Date/Time : 29/06/93 08:31 Software : Version 3.16

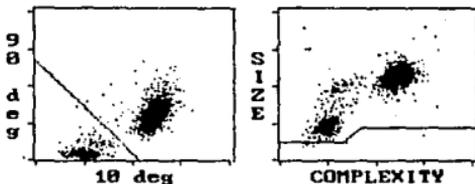
Specimen ID 28/502 22
 Patient VVM
 Sex DOB
 Dr
 Paras Set 1 Limit Set 1

28 Jun 1993 11:18
 Operator ID TRR
 Sequence # 3987
 Closed Saspier

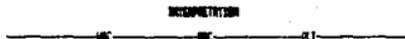
WBC: 5.2 K/uL
 NEU: 3.6 69.6 %N
 LYM: 1.3 24.1 %L
 MONO: 0.3 4.9 %M
 EOS: 0.0 0.8 %E
 BASO: 0.0 0.5 %B



RBC: 3.28 M/uL
 HGB: 10.0 g/dL
 HCT: 29.4 %
 MCV: 89.6 fL
 MCH: 30.4 pg
 MCHC: 34.0 g/dL
 RDW: 14.6 %



PLT: 425. K/uL
 MPV: 7.4 fL
 PCT: 0.31 %
 PDW: 16.5 10(GSD)



USER-DEFINED ABNORMALITIES:

Abn1

MODELO STKS

Principio COULTER

En el año de 1989 se lanza al mercado el sistema Coulter STKS que proporciona un hemograma completo y un diferencial totalmente automatizado, convirtiéndolo en un analizador de altos volúmenes.

Este instrumento mide simultáneamente el volumen de los leucocitos, la conductividad y la dispersión en las micromuestras de sangre total.

Las tecnologías empleadas son independientes una de otra y el conteo diferencial estudia alrededor de 8000 células en su estado nativo para cada diferencial reportado.

El principio usado para cada tecnología es el siguiente:

A) VOLUMEN

Es determinado usando el principio Coulter de Impedancia (fig. 19), en donde se emplea una corriente para medir el cambio en la impedancia que produce una célula a medida que pasa a través de una apertura; la magnitud de este cambio es proporcional al volumen de la célula.

El sistema consiste en aplicar una corriente en una solución isotónica que contiene la micromuestra de sangre, fig 14. Las células debido a la diferencia de potencial establecido y a la presión de vacío pasarán de la cubeta a

través de una celdilla o apertura; cada cambio en el potencial se observa en una pantalla de un osciloscopio y será proporcional al volumen de la partícula, se almacena y posteriormente se registra.

La Compañía Coulter con el afán de ofrecer mayor precisión y exactitud incluyó en sus modelos el conteo por triplicado de las partículas (fig 15) células blancas, células rojas y plaquetas.

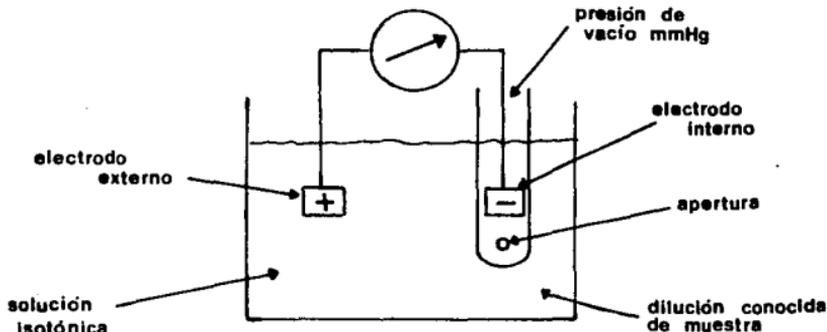


Fig. 14

El osciloscopio registra los pulsos producidos por las células de acuerdo a umbrales ya definidos.

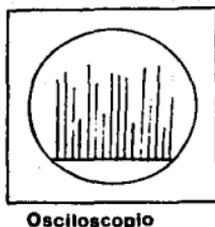
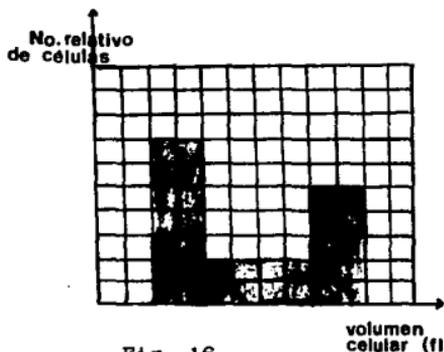


Fig. 15

Los pulsos registrados en el osciloscopio se transmiten a un analizador que es capaz de construir con esta información un histograma, fig. 16.



Histograma de volumen celular.

De las tres aperturas, las cuentas son estadísticamente analizadas para obtener un promedio. Se necesita cierta concordancia por lo menos en dos de ellas para validar el promedio, si no lo es, será señalado instrumentalmente, fig. 18.

Con la información de los leucocitos y con el uso del histograma es posible obtener el porcentaje y el número absoluto de la población de linfocitos, población de células mononucleares y de la población de polimorfonucleares.

El juego de aperturas donde se realiza el conteo de leucocitos tiene un determinado diámetro, de tal manera, que el sistema elimina todos aquellos pulsos "anormales" para

asegurar la integridad de la medida, fig. 17.

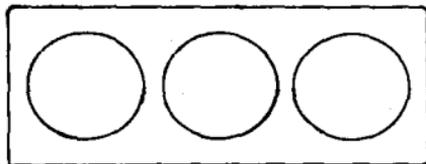


Fig. 17.

Juego de aperturas
para leucocitos
100 X 75 μ m

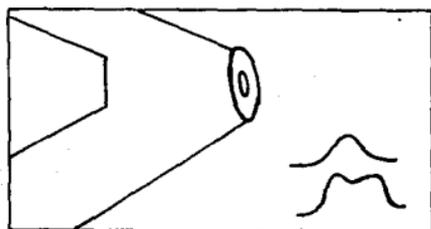


Fig. 18.

Tecnología de pulso
único. Una apertura.

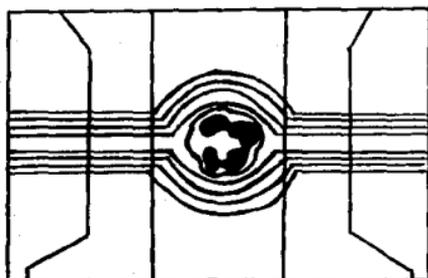


Fig. 19.

El volumen celular
es determinado usando
el principio Coulter de
Impedancia.

B) CONDUCTIVIDAD

Una energía electromagnética de alta frecuencia detecta intrínsecamente el interior de la célula para proporcionar así una información adicional sobre su composición física y química, fig. 20.

De esta manera, la incidencia de alta frecuencia sobre cada partícula es diferente a la primera dependiendo del contenido de cada célula.

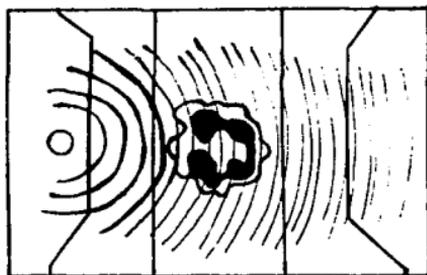


Fig. 20.

la conductividad celular es determinada usando una energía electromagnética de alta frecuencia, la cual proporciona información acerca de los constituyentes internos de la célula.

C) DISPERSION

La cantidad de luz dispersada para cada célula que pasa a través de un haz monocromático láser proporciona información sobre la estructura y tamaño de la célula.

Se incide un rayo láser sobre la partícula en cierto ángulo de tal manera que la luz dispersada determine las características de la superficie, su morfología y su granularidad, fig. 21.

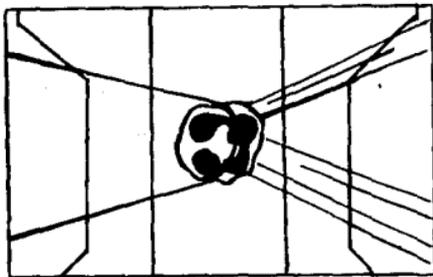


Fig. 21.

Rayo láser sobre la célula y la dispersión provocada de la luz.

Si se unen estas tres tecnologías proporcionan un estudio completo de las características de los leucocitos para una clasificación confiable, fig. 22.

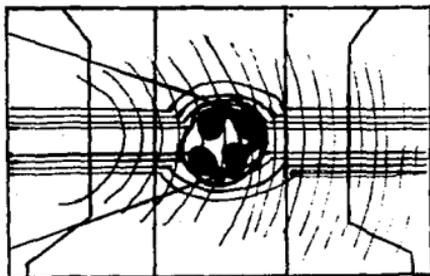


Fig. 22.

Volumen (impedancia), conductividad y dispersión en el estudio de las características de las células blancas.

Y una cuarta medición hecha, es la opacidad celular, un valor derivado para eliminar el volumen de la medida de conductividad. Permitiendo aún mayor exactitud en la medición del contenido celular, fig. 23.

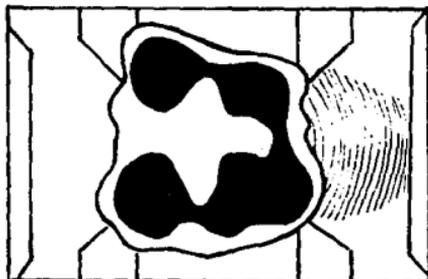


Fig. 23.
Determinación de la
opacidad celular.

En el STKS, la alineación de cada célula de acuerdo a su volumen, conductividad y dispersión de la luz hace que cada una de ellas pueda ser situada en una rejilla. Este agrupamiento de las células, basado en las características que presenta, claramente separa las poblaciones de células normales.

Alrededor de 16 millones de puntos pueden ser considerados para el análisis dentro de la matriz tridimensional en cada muestra para dar el más completo perfil del leucocito.

Las células blancas son analizadas en su estado nativo sin rompimiento o tinción, tanto que ellas se conservan intactas en su contenido, extensión y complejidad. Con el fin

de asegurar este objetivo el instrumento requiere de los siguientes reactivos:

a) Diluyente isotón III

Para el conteo y tamaño celular exacto, el isotón III estabiliza la membrana celular mientras se forma el flujo de leucocitos y sea presentado a la parte óptica en perfecto alineamiento.

b) Agente lítico Diff III (Lyse S)

Que lisa rápida y completamente los glóbulos rojos; simultáneamente se hace la lectura de la Hemoglobina.

c) Scatter Pak

Es la llave para evaluar las células blancas en su estado nativo y consta de un par de reactivos con doble propósito.

- El agente lítico Erythrolyse II, que lisa las células rojas y diluye la muestra.
- El agente Stabilyse que preserva la estructura, las características de la superficie y tamaño de los leucocitos para las mediciones de volumen, conductividad, dispersión de la luz y opacidad.

d) Controles celulares 4C plus

Extrema la sensibilidad y el más amplio rango de valores

posibles de manera que asegura la más alta precisión y exactitud.

e) Control Latron

Asegura la exactitud de las mediciones tridimensionales del volumen, conductividad y dispersión de la luz. Este modera la capacitancia y una linealidad del flujo láser.

f) Calibrador S-Cal

Proporciona valores simples (que se pueden trazar para métodos de referencia) para la calibración exacta del instrumento sin necesidad de un servicio.

Está conformado por todo un paquete que ofrece seguridad al analista contra accidentes en la manipulación de reactivos y productos biológicos. Por ejemplo: tubos viales cerrados con tapa penetrable.

Una vez analizadas las células, los datos son presentados como una gráfica (hemograma) tridimensional, que puede ser desplegado en una terminal de computadora.

Al familiarizarse con el hemograma se hace posible identificar la presencia de anomalías y de subpoblaciones rápidamente. Además de que se cuenta con un criterio de señalización o "abanderamiento" en donde se recomienda poner mayor énfasis o en su defecto, detenerse a una observación de conteo manual.

El hemograma proyectado tiene la siguiente disposición:
(fig. 24).

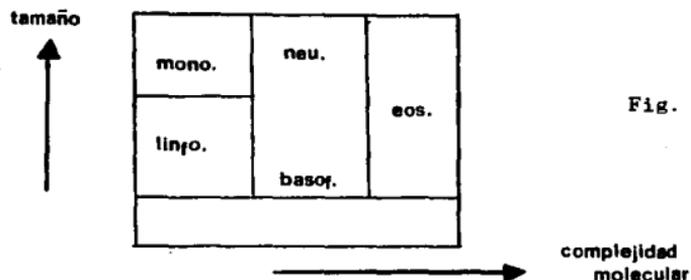


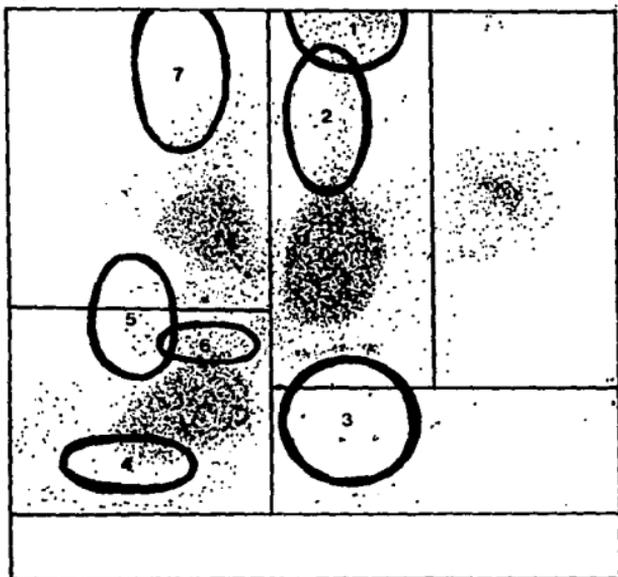
Fig. 24.

En este cuadro claramente se observa que dentro de las células más pequeñas y menos complejas encontramos a los linfocitos; por encima de ellos están las células de gran tamaño, pero no complejas, como son los monocitos. Al lado de ambos, y en la parte media, se sitúan las células más abundantes en muestras normales, los neutrófilos. Por debajo de éstos, localizamos los basófilos. En la última casilla exterior derecha están los eosinófilos que tienen el mismo tamaño de los neutrófilos pero por su complejidad interna es monitoreada de diferente manera por el sensor del STKS.

Un ejemplo de anomalías o subpoblaciones que pueden identificarse gracias a esta disposición son sospechas de blastos, células inmaduras, linfocitos transformados, etc.,
fig. 25.

leucocitos

V
O
L
U
M
E
N

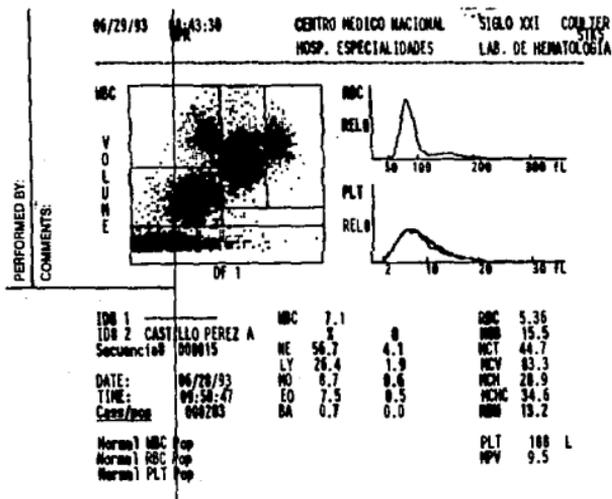


DIFERENCIAL

Fig. 25. Donde: 1. Sospecha de blastos; 2. Sospecha de granulocitos inmaduros; 3. Neutrófilos dañados; 4. Linfocitos transformados; 5. Sospecha de blastos; 6. Linfocitos transformados y 7. Sospecha de blastos.

Se anexa un registro de resultados de laboratorio de Hematología comúnmente reportado para una muestra sanguínea.

En este reporte se visualiza tres diagramas, uno para células blancas, otros células rojas y un tercero para plaquetas. Se proporciona datos del paciente, fecha, resultados obtenidos de fórmula blanca, fórmula roja y algunas observaciones.



W 691

TABLA 2.

CARACTERISTICAS DE LOS INSTRUMENTOS HEMATOLOGICOS

	MODELO QBC II	MODELO DIFF 3	MODELO HEMALOC D	MODELO TH-1	MODELO CELL-DYN (CD 3000)	MODELO STRS
COMPAÑIA MANUFACTURADORA	BECTON DICKINSON	PERKIN ELMER CORPORATION (COULTER)	TECHNICON CORPORATION	TECHNICON CORPORATION	SEQUOIA-TURNER CORPORATION	COULTER ELECTRONICS
PRINCIPIO DE IDENTIFICACION	GRADIENTE DE DENSIDAD	MODELOS DE RECONOCIMIENTO COMPUTARIZADO	TECNICA DE FLUJO CONTINUO Y ELECTRO-OPTICO	CITOQUIMICA Y DE FLUJO (PEROX Y LOBULARIDAD)	DISPERSION DE LA LUZ POLARIZADA EN MULTIANGULOS	IMPEDANCIA DISPERSION CONDUCTIVIDAD
MUESTRAS HORA/DIFERENCIAL	30	25 - 30	60	60	90	120
POBLACIONES EN LA DIFERENCIAL	CUENTA DE PMN Y CELULAS MONO NUCLEARES	S. LINF. NEU. EOS, BASOF. MONOCITOS	S. LINF. NEU. EOS, BASOF. MONOCITOS	S. LINF. NEU. EOS, BASOF. MONOCITOS Y CEL. LUC	S. LINF. NEU. EOS, BASOF. MONOCITOS	S. LINF. NEU. EOS, BASOF. MONOCITOS
SISTEMA AUTOMATICO	NO	SI	SI	SI	SI	SI
REACTIVOS A USARSE INCLUYENDO LIMPIADORES	REACTIVOS REVELADORES	REACTIVOS DE TINCION POLICROMATOFILA	12	12	4	6

Pruebas de concordancia

Con el propósito de evaluar el desempeño de los instrumentos hematológicos disponibles comercialmente, se han realizado una serie de pruebas comparativas entre cada uno de ellos.

Son muy variadas las pruebas hechas, sin embargo aquí se presentan dos evaluaciones que muestran la imprecisión e inexactitud en la determinación de la cuenta diferencial de leucocitos.

I.- Evaluación de tres analizadores hematológicos automatizados.

La evaluación fue hecha de acuerdo a los lineamientos del International Committee for Standardization in Haematology protocols and the National Committee for Clinical Laboratory Standards H 20-T standard, usando el mismo grupo de pacientes simultáneamente.

Los instrumentos probados fueron: Technicon H-1, Coulter STKS y CELL-DYN (CD 3000). Todos ellos dan una cuenta de cinco (STKS y CD 3000) o seis (H-1) poblaciones de la cuenta diferencial de leucocitos. El CD 3000 es el único instrumento que requirió de agitación manual, todos los demás cuentan con un equipo automático. Todos aspiraron muestras en viales cerrados.

Los instrumentos fueron calibrados de acuerdo a las especificaciones de las compañías manufactureras y

monitoreados constantemente a través de chequeos de control de calidad internos.

El total de muestras de sangre analizadas fue de 263. Se prepararon cuatro frotis de cada espécimen recolectado; el método de referencia consistió de una cuenta diferencial microscópica manual de 800 células, hecha por cuatro especialistas clínicos. Cada operador ejecutó una cuenta de 200 células en cada uno de los frotis distribuidos al azar.

La imprecisión de los instrumentos fue medida dentro y entre cada uno de los lotes, por medio de dos métodos estadísticos (análisis de regresión lineal y análisis de varianza).

La evaluación de la inexactitud fue hecha comparando el método de referencia a través de regresión lineal.

Debido a que la comparación fue hecha entre cinco poblaciones de leucocitos, algunas aproximaciones fueron necesarias. La sexta población del H-1, por arriba de un valor de 4% fue añadida a los linfocitos; valores más altos fueron considerados anomalías morfológicas y la muestra fue excluida de la evaluación.

De tal manera que de las 263 muestras, 61 fueron excluidas, contando finalmente con 202 muestras.

Resultados

A) Imprecisión

Las tablas 3, 4 y 5 indican una moderada imprecisión dentro y entre los lotes. La imprecisión, expresada como un porcentaje del coeficiente de variación fue más bajo entre los instrumentos que dentro del método de referencia, éste es directamente relacionado a el número, mejor que el tipo, de células observadas (la imprecisión disminuye junto con el incremento en el número de células observadas).

TABLA 3.

IMPRECISION DENTRO DEL LOTE: MUESTRAS DUPLICADAS DE PACIENTES.*

PARAMETRO	T H-1			CD. 3000			C. STKS		
	a	b	r	a	b	r	a	b	r
NEUTROFILO:	0.331	1.005	0.957	1.717	0.0569	0.990	1.387	0.963	0.955
LINFOCITOS	0.211	0.994	0.991	1.829	0.945	0.975	0.011	0.995	0.990
MONOCITOS	0.533	0.923	0.662	0.524	0.912	0.595	0.432	0.916	0.957
EOSINOFILO:	0.123	0.958	0.985	0.065	0.989	0.990	0.024	1.000	0.995
BASOFILOS	0.088	0.873	0.896	0.215	0.812	0.738	0.181	0.699	0.578

a² intercepción

b² pendiente

r² coeficiente de correlación (todos los coeficientes de correlación Pearson fueron significantes (P<0.001)).

* n=202

TABLA 4.

IMPRECISION DENTRO Y ENTRE EL LOTE.*

PARAMETRO	T. H-1 C.V. %			CD. 3000 C.V. %			C. STES C.V. %		
	MEDIA	MEYRD	ERTRE	MEDIA	MEYRD	ERTRE	MEDIA	MEYRD	ERTRE
NEUTROFILOS %	56.29	1.57	1.61	54.78	1.63	1.88	55.44	2.11	2.10
LINFOCITOS %	35.93	2.45	2.50	35.37	3.77	4.12	35.81	1.61	1.61
MONOCITOS %	6.19	9.41	9.40	5.68	14.35	18.02	5.40	5.95	6.22
EOSINOFILOS %	2.62	9.40	10.94	3.44	7.73	6.99	2.90	6.25	7.69
BASOFILOS %	0.73	17.56	17.71	0.98	18.60	17.50	0.75	40.9	48.0

* Ocho muestras (sangre fresco normal) analizadas por triplicado en cuatro lotes.

CV = Coeficiente de Variación

TABLA 5.

IMPRECISION DENTRO DEL METODO DE REFERENCIA. **

PARAMETRO	MEDIA	C.V. %
NEUTROFILOS	56.33	5.57
LINFOCITOS	34.52	6.64
MONOCITOS	5.65	25.90
EOSINOFILOS	2.98	39.31
BASOFILOS	0.49	96.29

* Cuatro patólogos clínicos

** Descartadas cuentas diferenciales

+ Muestras 202

C.V. = coeficiente de variación

En general la imprecisión entre los instrumentos también dependió del número de células contadas, con la excepción del CD 3000, en el cual la imprecisión también pareció estar unida al tipo de población analizada; tal es el caso de monocitos.

Algunos éxitos analíticos, tales como aquellos propuestos por Fraser, fueron el coeficiente de variación entre el lote en todos los instrumentos, para neutrófilos y linfocitos (CV= 1.61 en el H-1 con respecto a un objetivo de 12.3 para neutrófilos; de 1.61 en el STKS a 4.12 en el CD 3000, con un objetivo de 5.4 para linfocitos). Para monocitos, únicamente el STKS cayó dentro de los objetivos propuestos (CVX= 6.22 con respecto a un máximo de 7.0).

Después de todo, sería confirmado que la imprecisión analítica instrumental es más baja que la del método microscópico.

B) Inexactitud

Los coeficientes de correlación observados (tabla 6) presentaron un acuerdo muy positivo entre los instrumentos y el método de referencia; para neutrófilos (r fue entre 0.974 en el H-1 y 0.916 en el CD 3000); para linfocitos (r estuvo entre 0.968 en el STKS y 0.888 en el CD 3000) y para eosinófilos (r fue entre 0.948 en el H-1 y 0.896 en el CD 3000).

Un dato notorio es el de monocitos en el CD 3000, pero

puede explicarse de diversas formas, una de ellas es que estas células pudieron haber dependido de su presencia tan reducida en la muestra examinada y una segunda a la dificultad de los aparatos en la identificación de esas células.

En cuanto a basófilos, la baja correlación con el método de referencia fue probablemente debido al bajo número e irregular distribución de las células en los frotis de sangre periférica; al mismo tiempo, sin embargo diferencias notables existieron para esta población, aún entre instrumentos. Esto indica que las tecnologías diferentes no siempre reconocieron el mismo tipo de célula.

Estos estudios hicieron posible notar que todos los instrumentos fueron capaces de hacer cuenta diferencial de leucocitos en sujetos normales y en aquellos con anomalías distribucionales de leucocitos, con exactitud satisfactoria para neutrófilos, linfocitos, y eosinófilos, pero menos satisfactoria para monocitos y basófilos.

TABLA 6. LA INEXACTITUD, COMPARANDO PRUEBAS CONTRA METODO DE REF. †

PARAMETRO	T H-1			CD. 3000			C. STKS		
	a	b	r	a	b	r	a	b	r
NEUTROFILOS	2.238	0.941	0.974	2.145	0.919	0.916	1.112	0.961	0.973
LINFOCITOS	0.378	0.955	0.961	3.154	0.867	0.888	1.969	0.924	0.968
MONOCITOS	3.196	0.726	0.717	1.925	0.835	0.553	3.130	0.667	0.757
EOSINOFILOS	1.188	1.014	0.948	2.053	0.844	0.896	0.033	1.006	0.949
BASOFILOS	2.586	0.405	0.532	4.444	0.059	0.078	3.187	0.328	0.237

a= intercepción

b= pendiente

r= coeficiente de correlación (todos los coeficientes de correlación Pearson fueron significantes (P< 0.001))

† Datos transformados

+ n= 202

II.- Evaluación de las cuentas diferenciales de leucocitos.

Comparación de Coulter VCS, Technicon H-1 y Método Manual de 800 células.

Esta evaluación incluyó la estimación de la exactitud, imprecisión y detección de neutrófilos inmaduros.

Un total de 300 muestras de pacientes fueron analizadas dentro de los lineamientos especificados por el Human Studies Committee of Veterans Administration Medical Center, Minneapolis, Minnesota.

Los especímenes se colectaron en tubos Vacutainer con anticoagulante. Fueron preparados por cada espécimen cuatro frotis sanguíneos.

Dos grupos de cuatro operadores ejecutaron las cuentas diferenciales completas. Cada miembro de un grupo hizo una cuenta de 200 células independientemente, de tal manera que al final se tuvieron un total de 800 células analizadas. Las diferencias par entre réplica uno y réplica cuatro fueron usadas para evaluar la imprecisión instrumental.

Los datos de células LUC detectados para la metodología H-1 fueron arbitrariamente incluidos dentro del grupo de linfocitos para determinaciones exactas. Por la falta de un criterio establecido, ningún ensayo fue hecho para proporcionar las células LUC dentro de las categorías de linfocitos y monocitos con propósitos estadísticos.

La baja frecuencia de tipos celulares tales como

basófilos, eosinófilos y monocitos complicaron el análisis de varianza entre el instrumento y las bases de datos de referencia, así como también, estimaciones al azar y errores sistémicos.

Los resultados obtenidos en cuanto a la imprecisión fueron los siguientes: (tabla 7)

Para monocitos la imprecisión es significativamente más grande en el H-1 que para el VCS. En general podríamos decir que los errores proporcionales son similares para ambos instrumentos, excepto para monocitos y basófilos, los cuales están completamente lejanos de un ideal (1.00) para ambos instrumentos.

De nueva cuenta este fenómeno se apoya en el hecho de que hay un rango muy estrecho y la dispersión de datos para ese tipo de células en condiciones pobres de linealidad, Tabla 8.

TABLA 7.

**IMPRECISION PARA UNA CUENTA DIFERENCIAL DE
 LEUCOCITOS NORMAL
 (n= 30 REPLICAS PARA CADA INSTRUMENTO)**

	<u>MANUAL</u> <u>DIFERENCIAL</u> (%) *	<u>TECNICON</u> <u>H-1</u>		<u>COULTER VCS</u>	
		<u>MEDIA</u>	<u>SD</u>	<u>MEDIA</u>	<u>SD</u>
LEUCOCITOS (%)	30	23.34	0.52	27.29	0.43
No. ABSOLUTO*	ND	2.17	0.06	2.53	0.06
CELS. LUC		3.24	0.20	SIN COMPARACION	
No. ABSOLUTO		0.3	0.02	SIN COMPARACION	
MONOCITOS (%)	4	5.83	1.29	5.37	0.22
No. ABSOLUTO	ND	0.54	0.12	0.50	0.01
NEUTROFILOS (%)	64	65.60	1.18	64.90	0.52
No. ABSOLUTO	ND	6.09	0.14	6.03	0.06
EOSINOFILOS (%)	0	1.29	0.17	1.11	0.16
No. ABSOLUTO	ND	0.12	0.01	0.19	0.01
BASOFILOS (%)	2	0.71	0.08	0.51	0.15
No. ABSOLUTO	ND	0.07	0.01	0.04	0.05

* Diferencial manual con los promedios de 200 células analizadas y clasificadas
 + Números absolutos de células $\times 10^3/l$
 ND = no hecho

TABLA 8.

IMPRECISION INSTRUMENTAL BASADO EN DIFERENCIAS PAR

	<u>COULTER VCS</u>			<u>TECHNICON H-1</u>		
	MEDIA GRUPAL (%)	DIFERENCIA MEDIA (%)	D.S. [^] DE LA DIFERENCIA	MEDIA GRUPAL (%)	DIFERENCIA MEDIA (%)	D.S. [^] DE LA DIFERENCIA
NEUTROFILOS	59.93	0.12	0.99	69.44	-0.07	1.23
LINFOCITOS	24.07	0.12	1.09	18.56	0.11	0.94
MONOCITOS	6.34	0.03	0.42	6.72	-0.13	1.02
EOSINOFILOS	3.95	-0.17	0.42	2.49	-0.02	0.41
BASOFILOS	0.71	-0.08	0.33	0.66	-0.01	0.14
CELS. LUC	SIN COMPARACION			2.13	0.11	0.49

(réplica 1 menos réplica 4) para Technicon H-1 (N=175) y Coulter VCS (N=148) especímenes de pacientes no marcados

* ± 1 DS

TABLA 9.

**SENSIBILIDAD CLINICA, COULTER VCS Y TECNICON H-1
CONTRA METODO DE REFERENCIA**

METODO DE REFERENCIA	METODO DE PRUEBA (NO. DE CASOS)							
	N		D		H		TOTAL	
	VCS	N-1	VCS	N-1	VCS	N-1	VCS	N-1
N	69	57	1	1	2	13	71	71
D	0	0	40	51	41	30	81	81
H	15	6	27	68	106	74	148	148
TOTAL	84	63	67	120	149	117	300	300

	NO. - 300	VCS %	NO. - 300	N - 1 %	REFERENCIA %
EN ACUERDO	214	71.3	182	60.7	
FALSOS NEGATIVOS EN LA DISTRIBUCION	0	0.0	0	0.0	ND
FALSOS NEGATIVOS MORFOLÓGICOS	42	14.0	74	24.7	ND
(Corregidos para referencia FF)	29	9.7	62	20.7	
FALSOS POSITIVOS EN LA DISTRIBUCION	1	0.3	1	0.3	NL
FALSOS POSITIVOS MORFOLÓGICOS	2	0.7	13	4.3	4.4

N= normal

D= distribucionalmente anormal

H= morfológicamente anormal

ND= no hecho

Considerando la sensibilidad clínica en valores absolutos (Tabla 9) para cada instrumento, se observa que hay una mayor concordancia entre los datos del Coulter VCS y el método de referencia que los del H - 1.

Cuando el método de referencia detectó neutrófilos inmaduros (Tabla 10), el VCS estuvo de acuerdo en 101 de 143 (70.6 %) , mientras el acuerdo para el H - 1 fue únicamente de 50 de 143 (35 %). Veintinueve de los casos no señalados por el VCS fueron determinados como falsos negativos, 13 casos verdaderos negativos por ambos instrumentos fueron falsos positivos para el método de referencia. Esos 13 casos tuvieron cuentas de leucocitos dentro de los límites normales y únicamente un metamielocito fue detectado en el método diferencial de referencia de 800 células.

En el grupo entero de 300 casos, hubo 3 falsos positivos para el H - 1 con señales de blastos.

La presencia de señales de neutrófilos inmaduros también fueron encontrados en casos en los cuales el método de referencia no los reportó (Tabla 10). Un total de 54 casos fueron señalados por uno o ambos instrumentos, sugiriendo la presencia de neutrófilos inmaduros.

Siete de estos casos fueron normales, determinados así por el método de referencia y por revisión clínica. Tres de esos siete fueron falsos positivos, determinados por el VCS y 6 fueron falsos positivos para el H-1.

Los casos distribucionalmente anormales determinados por

el método de referencia, fueron divididos dentro de tres grupos. Los dos primeros grupos fueron divididos en base al número absoluto de formas banda (tabla 10, categorías distribucionales A y B).

El problema que se presenta entonces es la identificación de formas banda en un espécimen, aún para experimentados analistas.

A partir de esto, podemos decir que el Coulter VCS está más capacitado que el H-1 en la identificación de leucocitos en un espécimen sanguíneo, proporcionando mayor confiabilidad en las muestras marcadas instrumentalmente.

TABLA 10.

**METODO DE REFERENCIA DETECTANDO
NEUTROFILOS INMADUROS CONTRA
MARCADO INSTRUMENTAL**

	MARCADO INSTRUMENTAL			
	VCS		H-1	
	No. CASOS	%	No. CASOS	%
CON MARCA	101	70.6	50	35.0
SIN MARCA	42	29.4	93	65.0
TOTAL	143	100.0	143	100.0
CASOS DESPUES DE UNA REVISION CLINICA				
TP ^a	101	70.6	49	34.3
FN	29	20.3	80	55.9
TN	13	9.1	13	9.1
FP	0	0.0	1	0.7
TOTAL	143	100.0	143	100.0

^a TP = verdadero positivo: clínicamente soportados por señal analizadora; FN = falsos negativos: clínicamente soportado por método de referencia sin señal analizadora; TN = verdadero negativo: sin problema clínico y sin señal analizadora y FP en método de referencia; FP = falso positivo: sin soporte clínico para señal analizadora.

TABLA 11.

DESVENTAJAS DE LOS INSTRUMENTOS HEMATOLOGICOS

MODELO QBC II	MODELO DIFF 3	MODELO HEMALOG D Y T.H-1	MODELO CELL-DYN (CD-3000)	MODELO STKS
<ul style="list-style-type: none"> - No discrimina los tipos celulares. - semicuantitativa. 	<ul style="list-style-type: none"> - Diferenciación celular limitada - Alterado por pleomorfismo celular 	<ul style="list-style-type: none"> - Reactivos caros. - Resultados inentendibles. - Numerosos resultados con alguna alteración por la reacción de peroxidasa. - Alta mecánica y mantenimiento. - El proceso de inicio y calibración son consumidores de tiempo. - Se sobrecalienta y su productividad disminuye. - Complicada manipulación. 	<ul style="list-style-type: none"> - Diferenciación celular limitada. - Agitación (manipulación manual). 	<ul style="list-style-type: none"> - Ideal para volúmenes grandes de muestras. - Requiere de ambientación.

DISCUSION

Las estrategias para la evaluación de Instrumentos hematológicos han sido sujetos a un prolongado debate y cuestiones relacionadas a los contadores de leucocitos diferenciales automatizados han sido especialmente controvertidos.

La información obtenida a lo largo de este trabajo y los datos comparativos de los instrumentos hematológicos nos llevan a recalcar que esas cuestiones están relacionadas con las siguientes características:

para cada diferencial reportado se tiene:

- menor disposición de tiempo
- mayor número de células contadas
- menor manipulación de la muestra
- análisis estadístico
- valores finales disponibles y graficados
- resultados reportados confiables
- posibles diagnósticos (sólo en algunos)
- observaciones

A pesar de que con el objeto de evaluar los instrumentos hematológicos se han hecho estudios comparativos (pruebas de concordancia), entre uno y otro, ninguno de ellos presenta las mismas características o comportamiento frente al trabajo rutinario.

No es lo mismo hablar de 200 muestras en cierto periodo,

que cuando la carga de trabajo de Centros Hospitalarios excede esa cifra más los exámenes urgentes. Entonces el aparato no permanecerá encendido un periodo corto de tiempo sino la mayor parte del día.

De esta actividad se desprende que algunos tiendan a reportar cifras por arriba de las normales, así por ejemplo: células inmaduras en forma de banda, monocitos, etc., sin dejar de mencionar a los que funcionan a base de reconocimiento de imágenes.

Y como una contradicción de la utilización de equipo automatizado, surge el comentario de que la mayoría de ellos siguen el criterio de clasificación americano, mientras que por conteo manual del diferencial de leucocitos el criterio a seguir es el de la escuela francesa. Un nuevo obstáculo a la hora de analizar los resultados reportados.

Cabe señalar que las características de los aparatos deben ser adecuadas a las necesidades laborales desde un punto de vista cuali y cuantitativo.

No existe un mejor instrumento, sino el aprovechamiento al máximo del potencial de cualquiera de ellos.

Debe quedar el aparato automatizado al servicio del analista y no el analista al servicio del Instrumento Hematológico.

CONCLUSION

Aún cuando un laboratorio de Hematología logre auxiliarse de un equipo automatizado para realizar cuentas diferenciales, éstos, a pesar de utilizar altas tecnologías en la diferenciación celular, todavía no son capaces de reportar células anormales, por ejemplo: en patologías como leucemias, eosinofalias, etc., e incluso subtipos celulares (células del mismo tipo en estado de maduración diferente, por ejemplo: células banda), de ahí que la adquisición de estos instrumentos sea aprovechado en un futuro, con el objeto de que el analista dedique toda su atención a las muestras que de alguna manera el aparato señala como "revisión manual".

Casi todos los procedimientos automatizados cuentan con un analizador de datos computarizado por lo que los valores finales son disponibles gráficamente y son susceptibles de regresar de nueva cuenta a ellos, gracias a la memoria con que cuentan.

Es necesario que cada laboratorio aplique su propio criterio en la selección de esas muestras a revisar, y de ser posible integre dentro del paquete o memoria de la computadora éste. Así, cuando se obtengan los valores analizados no se tenga una larga fila de frotis a revisar.

Es posible esperar que en un futuro sean desarrolladas o perfeccionadas nuevas tecnologías que permitirán cometer

menos errores desde la manipulación de la muestra hasta los principios de diferenciación utilizados por cada aparato. De tal manera que obtengamos un valor preciso y exacto.

Es deseable que en equipos automatizados se cuente un número suficiente de células en cada frotis para obtener una alta probabilidad de encontrar al menos una célula anormal.

Así mismo, es indispensable estar concientes que uno de los principales obstáculos, sino es el primero, con que se tropieza un laboratorio de Hematología es el costo de un equipo de tal magnitud y/o sus reactivos.

A pesar de todo, una cuenta diferencial automatizada ofrece elevar la calidad en el trabajo y bien valdría la pena, valorar todos esos detalles.

BIBLIOGRAFIA

- John D. Bauer, et-al. Análisis Clínicos. Métodos e interpretación. Ed. Reverté, S.A.. Barcelona, 1986. Pág.: 193-223.
- Woodliff H:J:, et-al. Hematología Clínica. Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V. 1981. Pág.: 15-18
- Williams J. William, M.D., et-al. Hematology. 3rd edition. Mc. Graw Hill, Book Company. N.Y. 1983. Págs: 11-13
- Automated Differentials in the Hematology Laboratory. Forefronts, Epitome. Am. J. Clin. Pathol. 1990; 93(Suppl 1): S11-S16.
- Manual Coulter STKS. Hematology system. Coulter Corporation. 1991. U.S.A. Pág.: 1-31
- Evaluación del Coulter VCS. Contador Diferencial Automatizado, un citómetro de flujo hematológico. Coulter Electronics, inc. Florida, U.S.A. Junio. 1988.
- Evaluation of an automated blood smear analyzer. Am. J. Clin. Pathol. 71:685-694, 1979.
- Laboratory and Clinical Evaluation of white blood cell differential counts. Comparison of the Coulter VCS, Technicon H-1 and 800-cell Manual Method. Am. J. Clin. Pathol. 1991; 95:381-388.
- Visual and Automated Differential Leukocyte counts. A comparison study of three instruments. Am. J. Clin. Pathol. 71:695-703, 1979.
- The Hemalog D white cell differential system. The Journal of Histochemistry and cytochemistry. Vol 22 No. 7, Pág.: 711-724, 1974.
- Use of the Technicon H-1 in the characterization of Leukemias. Arch. Pathol. Lab. Med. 1986; 112: 889-894.
- Evaluation of an Automated Hematology System. (Technicon H-1). Arch. Pathol. Lab. Med. 1986; 110:803-808.
- The H-1 Hematology Analyzer. Arch. Pathol. Lab. Med. 1987; 11:521-524
- The Technicon H-1. An Automated Hematology Analyzer for today and tomorrow. Am. J. Clin. Pathol. 1987; 87: 71-78

- An Automatic Leukocyte Analyzer. Validity of its results.
Am. J. Clin. Pathol. 67:159-169, 1977.

- Accurate automated leukocyte differential counts, despite profound leucopenia. J. Clin. Pathol. 1988; 41:1236-1239.

- Trípticos de los instrumentos:

a) Mapping the future course for Hematology
CELL-DYN 3000

b) Un perfil hematológico a partir de un hematocrito.
QBC II.