

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

BIOMETRÍA HEMÁTICA CON MICROMUESTRA
UTILIZANDO EL TECHNICON H*1



GUATEMALA, MAYO DEL 2000

DL
06
T(2056)

JUNTA DIRECTIVA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

DECANA	LIC. HADA MARIETA ALVARADO BETETA
Secretario	LIC. OSCAR FEDERICO NAVE HERRERA
Vocal Primero	DR. OSCAR MANUEL COBAR PINTO
Vocal Segundo	DR. RUBÉN DARIEL VELÁSQUEZ MIRANDA
Vocal Tercero	LIC. RODRIGO HERRERA SAN JOSÉ
Vocal Cuarto	BR. DAVID ESTUARDO DELGADO GONZÁLEZ
Vocal Quinto	BR. ESTUARDO SOLÓRZANO LEMUS

DEDICO ESTA TESIS

A DIOS

**Que me ha dado oportunidades para
poder desarrollarme.**

A MIS PADRES

**Dr. José Gustavo Rendón Estrada.
Lic. María Isabel Oliva de Rendón.**

A MI ESPOSA

Ana Isabel Mansilla de Rendón.

A MIS HIJOS

**Gustavo Adolfo
Ana Gabriela
Isabel María**

A MI ABUELO

Dr. Rodrigo Rendón Cervantes

HERMANOS, FAMILIARES Y AMIGOS.

AGRADECIMIENTOS

**AL LIC. OSCAR ALVAREZ GILL POR SU APOYO INCONDICIONAL EN EL
DESARROLLO DE ESTA TESIS.**

**A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA DE LA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA POR BRINDARME LOS
CONOCIMIENTOS Y MI FORMACIÓN PROFESIONAL.**

**A BAYER DIAGNOSTICA QUIEN ME PROPORCIONARA EL EQUIPO Y
REACTIVOS NECESARIOS PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.**

ÍNDICE

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
ANTECEDENTES.....	3
JUSTIFICACIÓN.....	12
OBJETIVOS.....	13
HIPÓTESIS.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
RESULTADOS.....	19
DISCUSIÓN.....	21
CONCLUSIONES.....	22
RECOMENDACIONES.....	23
REFERENCIAS.....	24
ANEXO.....	29

1. RESUMEN

La utilización en el laboratorio de una micromuestra de sangre (300 μ l) para la realización de un Hemograma completo es una ventaja importante para el diagnóstico y el manejo del paciente pediátrico, principalmente en neonatología.

En el presente estudio se recolectaron muestras de sangre, seleccionadas de pacientes ambulatorios, con valores altos, normales y bajos, se almacenaron en dos tipos de viales distintos, para tres mililitros de sangre y para 300 microlitros, utilizando en cada uno de ellos EDTA di sódico como anticoagulante.

Todas las muestras fueron corridas en un analizador hematológico H*1 de Bayer Diagnostica.

Las muestras de 300 microlitros de sangre recogida en un vial con un miligramo de EDTA di sódico, es una muestra suficiente para la realización por duplicado de una biometría hemática en el Technicon H*1 de Bayer Diagnostica.

Los resultados obtenidos fueron tabulados y analizados estadísticamente utilizando el coeficiente de correlación de concordancia (rc).

Por medio de este estudio se pudo establecer que los resultados del hemograma completo proveniente de las muestras de 300 microlitros de sangre venosa recogida en un vial con EDTA di sódico, corrida en el analizador hematológico H*1, tienen la misma concordancia, por lo tanto son estadísticamente comparables con los resultados de muestras de 2 ml de sangre venosa obtenidas con técnicas convencionales, corridas en el mismo equipo.

Se recomienda implementar técnicas simple de recolección de micro muestras de sangre completa para ser analizadas en sistemas hematológicos automatizados y así ayudar al diagnóstico de pacientes pediátricos y neonatos.

2. INTRODUCCIÓN

Bajo la hipótesis de que una muestra de 300 microlitros de sangre venosa no difiere significativamente en su composición de las muestras de 2 mililitros obtenidas usualmente en el laboratorio, pero su volumen sí representaría una ayuda para el manejo del paciente pediátrico permitiendo el corrimiento por duplicado de la biometría hemática completa, en el Technicon H*1 de Bayer, se estudiaron 20 muestras con 2 repeticiones cada una con valores en niveles alto, normal y bajo, se trataron estadísticamente con el coeficiente de concordancia, comparando los resultados de las micro muestras con los obtenidos con los volúmenes tradicionales.

3. ANTECEDENTES

3.1 TECHNICON H*1

3.1.1 GENERALIDADES

Los adelantos científicos en el campo del análisis hematológico han permitido desarrollar instrumentos que cuentan con citómetros de luz láser, estudios citoquímicos y poderosos programas computacionales que al analizar la sangre del paciente son capaces de producir un resultado muy completo de los elementos celulares (3,6,7,11,13,15,23,28,30,32,40,41).

Tales estudios son reportados en una biometría hemática poco familiar para la generalidad de los médicos de nuestro medio en este momento; sin embargo los resultados reportados en este nuevo concepto de biometría hemática son ya una realidad en países desarrollados y lo serán en nuestro medio en un futuro próximo.

La literatura médica muestra ya una gran cantidad de divulgaciones y descubrimientos hematológicos que hacen uso de estos nuevos conceptos: el diagnóstico médico de las enfermedades se apoya en los estudios de los instrumentos modernos (1,2,4,14,16,20,21,22,25,26,27, 31,33).

El analizador hematológico Technicon H 1 es un instrumento automatizado que gracias a una tecnología muy desarrollada permite establecer el estado hematológico clínico del paciente mediante una combinación de resultados numéricos, señales morfométricas, citogramas e histogramas.

Proporciona información acerca de la morfología de las células sanguíneas anormales, que son evaluadas posteriormente en un estudio de sangre periférica visto al microscopio por el químico especialista o por el patólogo. Este instrumento utiliza los principios conocidos como Citometría de Flujo y Citoquímica de elementos sanguíneos para efectuar un recuento celular completo y una fórmula diferencial de sus resultados, siendo estos principios lo más avanzado en el campo del laboratorio de hematología (3,6,7,11,13,16,23,28,32,34,37,40).

En su funcionamiento se efectúan tres pasos fundamentales:

- a. Una reacción citoquímica prepara la sangre para análisis.
- b. Un citómetro estudia las propiedades celulares específicas.
- c. Algoritmos convierten las mediciones obtenidas en resultados familiares para el médico con relación a recuento celular y características de las células.

El Sistema H 1 se compone de cuatro canales básicos que se enumeran a continuación:

- A. Canal de Hemoglobina
- B. Canal de Peroxidasa
- C. Canal de Glóbulos rojos y plaquetas
- D. Canal de Basófilos y lobularidad nuclear

- A. En el canal de hemoglobina un reactivo químico se une a la hemoglobina liberada de los glóbulos rojos luego que éstos fueron destruidos y el producto coloreado resultante llamado cianometahemoglobina es analizado en un colorímetro (3,29, 32,34,36).
- B. En el canal Peroxidasa, los leucocitos son coloreados por esta sustancia y de acuerdo a la presencia de gránulos en el citoplasma pueden resultar células no coloreadas, poco coloreadas e intensamente coloreadas. Las células pasan por el canal óptico, su grado de coloración y su tamaño es analizado y posteriormente se representa cada elemento en forma gráfica en un citograma llamado PEROX; los conglomerados celulares son utilizados para efectuar la fórmula diferencial, el cálculo del índice de mieloperoxidasa y la enumeración de células grandes no coloreadas (LUC) (5,7,8, 15,16,21,22,26,33).

- C. En el Canal de Basófilos/lobularidad, un reactivo químico ayuda a distinguir a los Basófilos de los demás leucocitos; al pasar al canal óptico, un rayo de luz láser analiza el núcleo de estas células y diferencia si son mononucleares, polimorfonucleares, células inmaduras (Blastos) y glóbulos rojos nucleados, todas las células antes descritas son representadas en el citograma llamado "BASO" y la computadora analiza la cuenta de basófilos, la proporción de mononucleares y polimorfonucleares y los Blastos (2,4,5,7, 15,16,21,22,31,33).
- D. En el canal de Eritrocitos el rayo de luz láser que estudia el paso de estas células en el canal óptico es capaz de distinguir el número, volumen (tamaño) y densidad (color) de los eritrocitos y con tal información reporta:

El número de glóbulos rojos (HEM), volumen corpuscular medio (VCM), concentración media de hemoglobina corpuscular (CHCM), ancho de distribución de eritrocitos (RDW) ancho de distribución de hemoglobina (HDW), calcula hematocrito (HCT) y produce los histogramas de volumen y de concentración de hemoglobina eritrocítica. Los detectores del rayo láser determinan el número y volumen plaquetario; posteriormente, la computadora produce un histograma plaquetario donde se puede obtener el ancho de distribución de plaquetas y el plaquetocrito calculado (9,12,14,24,25,35,38).

3.1.2 DESCRIPCIÓN DEL REPORTE DE BIOMETRÍA HEMÁTICA

El instrumento es capaz de proporcionar hasta 9 reportes con resultados de la muestra estudiada; el más utilizado es el que a continuación se describe.

Se reportan en primer lugar los datos demográficos del paciente estudiado, el número secuencial de trabajo, día, hora e identificación de la muestra.

En el grupo de resultados numéricos se reportan las células sanguíneas y algunos índices calculados:

LEU: es el número de leucocitos en miles por milímetro cúbico ($\times 10^3/\text{ul}$).

HEM: es el resultado de glóbulos rojos en millones por milímetro cúbico ($\times 10^6/\text{ul}$).

- HB:** es la concentración de hemoglobina en gramos por decilitro de la muestra estudiada (g/dl).
- HCT:** hematocrito expresado en %.
- VCM:** volumen corpuscular medio de los eritrocitos en femtolitros (fl).
- HCM:** hemoglobina corpuscular media, es un índice obtenido de la medición promedio de la hemoglobina de los glóbulos rojos y se reporta en picogramos (pg).
- CHCM:** concentración de la hemoglobina corpuscular media, obtenido de la medición promedio de la hemoglobina de los glóbulos rojos y se expresada en gramos por decilitro (g/dl).
- RDW:** es el ancho de distribución de eritrocitos; este resultado corresponde al coeficiente de variación estadístico del volumen de los eritrocitos del paciente, una población normocítica (normal) dará un resultado entre 11.5 a 14.5%.
- HDW:** es el ancho de distribución de hemoglobina de los glóbulos rojos del paciente, normalmente hay 2.2 a 3.2 gramos por decilitro de variación en poblaciones eritrocíticas normocrómicas.
- PLQ:** número de plaquetas expresadas en miles por milímetro cúbico ($\times 10^3/\text{ul}$).
- VPM:** es el volumen plaquetario promedio que en condiciones normales varía entre 7.2 a 11.1 femtolitros (fl). Resultados por debajo o arriba de estos límites nos indicarán la existencia de plaquetas pequeñas o plaquetas gigantes respectivamente.

Cuando los resultados antes descritos son anormales, una letra indicará si es alto (H) ó bajo (L), respecto a los límites normales.

En la sección de alarmas morfológicas se reportan los cambios morfométricos de las células estudiadas: en la primera columna se describe el parámetro estudiado y en cruces el grado de severidad del cambio. El profesional responsable verificará la presencia de la anomalía mediante un estudio microscópico del frotis de sangre y en forma manuscrita escribirá los detalles de la anomalía en la columna verificada.

ANISO: Anisocitosis aparecerá cuando el ancho de distribución de eritrocitos es anormal ya sea de tipo microcítico o macrocítico o ambos.

ANISOCR: Anisocromasia indica que el HDW (ancho de distribución de la concentración de hemoglobina) es anormal, su presencia acompaña a las anemias hemolíticas ó megaloblásticas entre otras.

En el tercio inferior izquierdo del informe se reportan los resultados de la fórmula diferencial de los leucocitos; expresando los resultados en porcentaje (%) del lado izquierdo y en cifras absolutas en miles por milímetro cúbico a la derecha.

En esta sección no se observan los resultados de neutrófilos en banda y otras células; sin embargo si están presentes en cantidades anormales se reportarán en forma manuscrita en la sección de Alarmas morfológicas.

Nuevos resultados son reportados en la fórmula diferencial :

LUC: corresponde al grupo de células que el instrumento separó por sus características de ser grandes y no coloreadas con peroxidasa.

En este grupo se encuentran los linfocitos atípicos, inmunoblastos, eritroblastos, linfoblastos y mieloblastos, cuando exista más del 4% de estas células se informará de su presencia también en la sección de alarmas morfológicas.

La presencia de estas células se confirmará mediante un estudio microscópico de un frotis de sangre periférica y las características de tales células se reportarán en forma manuscrita.

IL: este resultado es un índice que se obtiene al analizar la relación de leucocitos polimorfonucleares sobre los mononucleares. Normalmente esta relación es de 1.9 a 3.0 y cuando el resultado es inferior a los límites indicará la presencia de más mononucleares, lo

que corresponde a una desviación a la izquierda. Este resultado se informa también en alarmas morfológicas mediante cruces de acuerdo al grado de severidad.

MPXI: es el índice de mieloperoxidasa de los granulocitos; un resultado normal de 7.2 a 11.1 indica que los gránulos de los neutrófilos tienen una cantidad adecuada de enzimas. Resultados disminuidos acompañan a deficiencia de la mieloperoxidasa y los valores altos a infecciones y sepsis.

OTROS: reporta la presencia de algunas anormalidades utilizando claves las más comunes son las siguientes:

N: indica la presencia de glóbulos rojos nucleados en circulación aunque también puede corresponder a ruido electrónico causado por fragmentos celulares (NOISE).

IG: corresponde a la presencia de granulocitos inmaduros del tipo de metamielocitos, mielocitos, promielocitos que generalmente acompañan a las infecciones severas o reacciones leucemoides.

PLT: indica que el número de plaquetas es anormal.

RBC Y WBC: indica que tanto los glóbulos rojos como los glóbulos blancos se encuentran en cantidades inadecuadas para un buen estudio.

El último histograma representa la distribución de plaquetas de acuerdo a su tamaño; en la línea horizontal se divide el volumen de 2 en 2 desde 0 a 20 femtolitros. En este histograma no se dan límites en cuanto al tamaño; sin embargo se puede apreciar el volumen plaquetario promedio como el nivel más alto del histograma y esto se describe como VPM en el recuento celular. De este histograma también se puede obtener información de la existencia de plaquetas gigantes de más de 15 micras cúbicas. Las plaquetas gigantes acompañan a las enfermedades caracterizadas por destrucción de estos elementos y las plaquetas pequeñas a los procesos hematológicos que afectan la médula ósea.

El informe hematológico reporta también los cambios morfométricos de los eritrocitos en una forma codificada que se describe en ALARM HEM: 0000.

El primer dígito de izquierda a derecha reporta la presencia anisocitosis, el 2o. si existe microcitosis ó macrocitosis, el 3o. a la anisocromasia y el 4o. a la presencia de hipocromia ó hiperchromia.

En igual forma se reportan las anormalidades de leucocitos mediante la señal ALARM LEU: 0000.

En el caso el primer dígito se refiere a desviación a la izquierda, el 2o. a la presencia de blastos, el 3o. a otras células anormales y el 4o. a los linfocitos atípicos; los cambios se gradúan en números del 1 al 6 en cada posición de acuerdo a la severidad de la anormalidad.

Después de evaluar los beneficios encontrados en la biometría hemática del Sistema Technicon H 1 es conveniente recordar las palabras del Dr. Maxwell Wintrobe eminente científico norteamericano y piedra angular de la Hematología desde hace muchos años: "sin lugar a duda estos instrumentos nos proporcionan datos muy útiles en forma muy rápida y muy exacta revelándonos detalles de los elementos de la sangre que no habíamos antes apreciado; sin embargo el paciente no debe perder la oportunidad de hablar y ser examinado por su médico y nunca debemos abandonar el estudio microscópico que deberá ser reconocido como recurso definitivo de evaluación hematológica."

Estos instrumento proporciona una enorme oportunidad de aprender y de investigar profundizando en el estudio de las anormalidades presentes en la sangre.

Además del informe ya explicado anteriormente, el instrumento es capaz de efectuar otros reportes de la sangre estudiada, que pueden obtenerse si se solicitan con anticipación una biometría hemática con estos reportes (3,6,7,11,13,23,28,29,30,31,32,35,37,40).

3.1.3 INDICADORES MORFOLÓGICOS

El rayo de luz láser y los detectores del canal óptico tienen la capacidad de analizar la textura nuclear, número de células y núcleos, volumen celular y densidad (color). Además la computadora del instrumento efectúa un análisis estadístico de los glóbulos rojos con relación a su volumen y a la concentración de hemoglobina; con tal información hace un análisis morfométrico y compara los hallazgos con información contenida en su memoria. Si encuentra discrepancias morfológicas en las células estudiadas, emite un reporte de tales hallazgos en la zona de alarmas morfológicas.

Tales anomalías son graduadas y marcadas con cruces de acuerdo a la severidad; los cambios morfológicos que reporta son para los glóbulos rojos; anisocitosis (diferencias de tamaño), microcitosis y macrocitosis, anisocromía, (eritrocitos con hemoglobinización variable) hipocromia e hiperchromia.

Del estudio de leucocitos reporta la presencia de células atípicas del tipo de linfocitos reactivos, células plasmáticas, células inmaduras (blastos) como Mielo, Mono y Linfoblastos, eritroblastos, inmunoblastos y otras células primitivas.

En una última categoría llamada "OTROS" reporta la presencia de anomalías en el número de las células sanguíneas, la presencia de glóbulos rojos nucleados y granulocitos inmaduros como metamielocitos, mielocitos y promielocitos; en estos casos se prepara un frotis de sangre periférica el cual es estudiado cuidadosamente al microscopio y los resultados se reportan por escrito, además del reporte normal que se envía en forma rutinaria. La computadora es capaz de producir otros reportes más sofisticados sobre cada una de las líneas celulares, los cuales se preparan a solicitud del médico, o por acuerdo del profesional responsable.

Estos estudios son de mucha utilidad para evaluar el diagnóstico de la anemia y seguir la respuesta al tratamiento.

Con relación a plaquetas se pueden obtener resultados numéricos, los cuatro primeros son de mucha utilidad en la evaluación de los padecimientos plaquetarios y son:

Plaquetas en miles por milímetro cúbico (PLQ), Volumen plaquetario (VPM), ancho de distribución de plaquetas (PDW) y Plaquetocrito (PTC) (3,6,7,13,23,33,34,40).

3.1.4 VALIDACIÓN DEL TÉCNICO H*1

Siguiendo las recomendaciones del Comité Internacional para estandarización en Hematología, se tomaron en cuenta evaluaciones del analizador hematológico H*1, el cual analiza 11 constituyentes, incluyendo el hemograma y el recuento diferencial leucocitario (RDL).

Los elementos tomados en cuenta son: imprecisión intraserie e interserie a tres niveles de concentración (bajos normal y alto), imprecisión total, linealidad, contaminación por arrastre, inexactitud respecto a métodos de referencia, respecto a sangre control, sensibilidad, especificidad y eficiencia, estabilidad de las muestras, así como diversos aspectos de la practicabilidad del analizador.

Los resultados de imprecisión intraserie, interserie y total, en general son aceptables, la linealidad ha sido muy buena, con un coeficiente de correlación lineal (r) superior a 0.98 en todos los constituyentes.

La contaminación por arrastre entre muestras ha sido baja, inferior al 0.6% para todos los constituyentes estudiados.

Se encontró muy buena correlación entre el H*1 y los métodos de hematocrito, neutrófilos linfocitos y eosinófilos. La correlación entre los resultados del H*1 y métodos manuales es aceptable para todos los constituyentes.

Las curvas de rendimiento diagnóstico (CRD) obtenidas en el estudio de la sensibilidad, especificidad y eficiencia del RDL, se acercan a la curva ideal en todos los casos, exceptuando la CRD obtenida para la monocitosis, en la cual la sensibilidad en el punto crítico es baja (33.1%), aunque la especificidad es muy buena (99.1%).

En conclusión, el sistema ha demostrado ser rápido, preciso y exacto, lo cual unido a su fácil manejo le convierte en un sistema muy útil para la realización del hemograma y RDL de cinco poblaciones en laboratorios con un elevado volumen de muestras (1, 5,6,13,32,40).

4. JUSTIFICACIÓN

La utilización de un pequeño volumen de sangre (300 ul) para la realización del análisis de laboratorio es una ventaja para el diagnóstico y el manejo del paciente pediátrico, principalmente en neonatología. Actualmente el analizador hematológico Technicon H*1 de Bayer Diagnostica es capaz de realizar biometrías hemáticas completas con sólo 100 microlitros de sangre. Sin embargo, no existen en la literatura científica datos que demuestren que esta pequeña muestra de sangre es representativa y no presenta variación significativa sobre las muestras hematológicas tradicionales de 2 ml.

Las razones anteriores justifican y hacen necesaria la realización del trabajo aquí propuesto.

5. OBJETIVOS

- 5.1 Demostrar que una muestra de 300 microlitros de sangre venosa recogida en un vial con un miligramo de EDTA di sódico, es una muestra suficiente para la realización por duplicado de una biometría hemática en el Technicon H*1 de Bayer Diagnostica.

- 5.2 Demostrar que los resultados del hemograma completo proveniente de una muestra de 300 microlitros de sangre venosa recogida en un vial con EDTA di sódico corrida en un analizador hematológico H*1 coinciden con los resultados de muestras de 2ml obtenidas con técnicas convencionales.

6. HIPÓTESIS

Una muestra de 300 microlitros de sangre venosa recogida en un vial con un miligramo de EDTA di sódico permiten la realización, por duplicado, de una biometría hemática completa utilizando el Technicon H*1 de Bayer Diagnostica y los resultados tienen concordancia con los obtenidos de las muestras tradicionales de 2 ml, corridas en el mismo equipo.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 UNIVERSO Y MUESTRA

7.1.1 UNIVERSO DE TRABAJO

El universo de trabajo consistió en 60 muestras de sangre, 20 de valores altos, 20 de valores normales y 20 de valores bajos, obtenidas de pacientes ambulatorios y preparadas para su análisis hematológico en dos tipos de viales distintos, uno con tres mililitros y otro con 300 microlitros utilizando en cada uno de ellos EDTA de sodio en igual proporción.

7.1.2 MUESTRA

Se utilizó sangre de pacientes ambulatorios, extraídas con jeringa, dos ml. colocadas en tubos de ensayo utilizando como anticoagulante siete mg. de EDTA de sodio y por triplicado se pondrán seis gotas de la misma sangre en microtubos de centrifuga conteniendo un mg. del mismo anticoagulante.

Para el estudio de la inexactitud con sangres control se utilizaron, Test-point Bayer, TO3-3234-51, TO3-3235-51 y TO3-3236-51 que corresponden a tres niveles de concentración (bajo, normal y alto).

7.2 MATERIALES

7.2.1 INSTRUMENTOS

Analizador hematológico H*1: sistema discreto que proporciona los resultados del hemograma y Recuento diferencial de Leucocitos (RDL) a partir de 100 ul de sangre anticoagulada. El H*1 utiliza un método óptico de análisis que identifica las células por la dispersión de la luz que producen sobre un campo oscuro, al incidir sobre ellas un rayo lumínico.

7.2.2 REACTIVOS

Los envasados y suministrados por Bayer Diagnóstica, que no necesitan manipulación previa a su uso.

EDTA di sódico 1 a 2 mg por ml de sangre.

7.2.3 CRISTALERIA

tubos de ensayo con volumen para 3ml.

viales para micro muestras

7.3 METODOS

Se recolectaron en total 60 muestras de sangre, seleccionadas de pacientes ambulatorios, 20 de valores altos, 20 de valores normales y 20 de valores bajos, se almacenaron en dos tipos de viales distintos, uno para tres mililitros de sangre y otro para 300 microlitros, utilizando en cada uno de ellos EDTA di sódico en igual proporción.

Todas las muestras serán corridas en duplicado en un analizador hematológico H*1.

Los resultados obtenidos fueron tabulados y analizados estadísticamente.

7.3.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

7.3.1.1 DISEÑO ESTADÍSTICO

7.3.1.2 TAMAÑO DE LA MUESTRA

Utilizando el recuento de leucocitos como el parámetro con mayor variabilidad al procesar una misma muestra de sangre diez veces consecutivas se obtuvo el resultado siguiente:

$$\text{LEU } X = 7571$$

$$DS = 0.231$$

$$Z = 0.053$$

$$IC = X \pm \frac{(Z \cdot \alpha/2)(S/\sqrt{n})}{L \cdot E}$$

$$N = \frac{NC^2 \sigma^2}{L \cdot E^2}$$

$$L \cdot E = Z \cdot (S/\sqrt{n})$$

$$N = \frac{Z^2 AS^2}{L \cdot E^2}$$

$$N = \frac{1.96^2 \cdot 0.053}{0.1^2} = 20 \text{ muestras}$$

Se procesaron 20 muestras para cada uno de los niveles de valores.

n = 20 muestras

7.5.2 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

A cada uno de los parámetros se le calculo su variación respecto del promedio de los resultados de las micromuestras y respecto de los de la muestra ordinaria, estos datos fueron sometidos a estudio de correlación del coeficiente de concordancia (r_c) (5,39).

$$r_c = \frac{S^2_1 + S^2_2 - S^2_{(1-2)}}{S^2_1 + S^2_2 + (y_1 - y_2)^2}$$

Los coeficientes de correlación de concordancia calculados fueron comparados contra la tabla siguiente para determinar su aceptación.

No Aceptable	menor de 0.5
Medianamente Aceptable	de 0.5 a 0.7
Aceptable	arriba de 0.71

8. RESULTADOS

Se analizaron 60 muestras de sangre, 20 de valores altos, 20 de valores normales y 20 de valores bajos, obtenidas de pacientes ambulatorios y preparadas para su análisis hematológico en dos tipos de viales distintos, uno con tres mililitros y otro con 300 microlitros utilizando en cada uno de ellos EDTA di sódico en igual proporción.

A cada uno de los parámetros se le calculo su variación respecto del promedio de los resultados de las micromuestras y respecto de los de la muestra ordinaria, estos datos fueron sometidos a estudio de correlación del coeficiente de concordancia (rc).

8.1 MUESTRAS DE VALORES BAJOS

Los Leucocitos mostraron un rc de 0.87, el recuento de Glóbulos Rojos un rc de 0.93, la Hemoglobina un rc de 0.99, el Hematocrito un rc de 0.99, las Plaquetas un rc de 0.97, los Neutrófilos un rc de 0.99 y los Linfocitos un rc de 0.99.

	Leucocitos	G.Rojos	Hb	HCt	Plaquetas	Neutrófilos	Linfocitos
rc	0.87	0.93	0.99	0.99	0.97	0.99	0.99

8.2 MUESTRAS DE VALORES NORMALES

Los Leucocitos mostraron un rc de 0.92 el recuento de Glóbulos Rojos un rc de 0.95 la Hemoglobina un rc de 0.91 el Hematocrito un rc de 0.99, las Plaquetas un rc de 0.98 los Neutrófilos un rc de 0.99 y los Linfocitos un rc de 1.00.

	Leucocitos	G.Rojos	Hb	HCt	Plaquetas	Neutrófilos	Linfocitos
rc	0.92	0.95	0.91	0.99	0.98	0.99	1.0

8.3 MUESTRAS DE VALORES ALTOS

Los Leucocitos mostraron un rc de 0.99, el recuento de Glóbulos Rojos un rc de 0.98, la Hemoglobina un rc de 0.98, el Hematocrito un rc de 0.99, las Plaquetas un rc de 0.99, los Neutrófilos un rc de 0.96 y los Linfocitos un rc de 0.99.

	Leucocitos	G.Rojos	Hb	HCt	Plaquetas	Neutrófilos	Linfocitos
rc	0.99	0.98	0.98	0.99	0.99	0.96	0.99

9. DISCUSIÓN

El análisis estadístico que se utilizó para comparar las 2 técnicas de análisis fue el coeficiente de correlación de concordancia, el cual expresa la concordancia entre dos técnicas de análisis cuantitativas (5,39).

9.1 MUESTRAS DE VALORES BAJOS

En este caso todos los valores de r_c de las muestras de pacientes con valores bajos se encuentran dentro del rango aceptable, esto es debido a que los resultados individuales del hemograma no demostraron variación significativa, al ser analizadas en el Technicon H1, por lo cual ambos métodos de recolección de sangre tienen concordancia para muestras comprendidas dentro de los rangos bajos.

9.2 MUESTRAS DE VALORES NORMALES

En este caso todos los valores de r_c de las muestras de pacientes con valores normales se encuentran dentro del rango aceptable, esto es debido a que los resultados individuales del hemograma no demostraron variación significativa, al ser analizadas en el Technicon H1, por lo cual ambos métodos de recolección de sangre tienen concordancia para muestras comprendidas dentro de los rangos normales.

9.3 MUESTRAS DE VALORES ALTOS

En este caso todos los valores de r_c de las muestras de pacientes con valores altos se encuentran dentro del rango aceptable, esto es debido a que los resultados individuales del hemograma no demostraron variación significativa, al ser analizadas en el Technicon H1, por lo cual ambos métodos de recolección de sangre tienen concordancia para muestras comprendidas dentro de los rangos altos.

10. CONCLUSIONES

10.1 Las muestras de 300 microlitros de sangre recogida en un vial con un miligramo de EDTA di sódico, es una muestra suficiente para la realización por duplicado de una biometría hemática en el Technicon H*1 de Bayer Diagnostica.

10.2 Con respecto a los resultados de coeficientes de correlación de concordancia podemos decir que ambos métodos de recolección de sangre determinan igual en todos los parámetros evaluados, ya que tienen la misma concordancia.

10.3 Al observar la correlación obtenida de los diferentes parámetros podemos afirmar que una muestra de 300 microlitros de sangre venosa recogidos en un vial con un miligramo de EDTA di sódico permiten la realización, por duplicado, de una biometría hemática completa utilizando el Technicon H*1 de Bayer Diagnostica y los resultados no tienen variación significativa de los obtenidos con las muestras tradicionales de 2 ml, por lo que este método puede sustituir al otro.

11. RECOMENDACIONES

La implementación de técnicas de recolección de volúmenes pequeños de sangre (300 ul), para la realización del hemograma completo que faciliten el diagnóstico y manejo del paciente pediátrico, principalmente en neonatología.

Incorporar de acuerdo a la disponibilidad de recursos metodologías que involucren analizadores hematológicos similares al Technicon H*1 de Bayer Diagnostica capaces de realizar biometrías hemáticas completas con sólo 100 microlitros de sangre, actualmente existen muchas alternativas de diferentes marcas de prestigio en Guatemala.

12. REFERENCIAS

1. Aymerich M, Jou JM, Vives Corrons JL, Insa MJ, Reverter JC, Pastor C. Evaluación del Autoanálizador Sysmex E 4000 en un Hospital Universitario. *Sangre* 1988 33:1-7
2. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwing WD, Matutes E, Orfao A, Van't Veer MB. European Group for the immunological characterisation of Leukaemias. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia*, 1995
3. Bollinger P, Drewinko B, Bralias CD, Smeeton NA, Trujillo JM. The Technicon H*1 An automated haematology analyser for today and tomorrow, *Am J Clin Pathol* 1987 87: 71-78
4. Bunyaratvej A, Boonkanta P, Nitiyanant Papibal S, Bhamarapranti. Automated cytochemistry in non-Hodgkin's lymphoma: a new method for determination of cells from lymph node biopsy. *Acta Haematol* 1986 75: 199-202
5. Clarke PT, Henthom JS, England JM. Differential white cell counting in the Coulter Counter Model S Plus IV (three) and the Technicon H-6000; a comparison by simple and multiple regression. *Clin Lab Haematol* 1985 7: 335-351
6. Davies D, Fisher G. The Validation and Application of the Technicon H*1 for the Complete Automated Evaluation of Laboratory Hematology. *Comp Hemat Inter* 1991 1: 91-105
7. De Cresce R. The Technicon H*1 : A Discrete Full Automated Complete Blood Count and Differential Analyser. *Lab Med* 1986 17: 17-21
8. Fossat C, Davis M, Harle JR, et al. New Parameters in Erythrocyte Counting. *Arch Path Lab Med* 1987 111: 1150-1154
9. Green R, Exploring Red Cell Analysis on the Technicon H*1 System. In Simson, E. *Proceedings of the Technicon H*1 Haematology Symposium*. 1986 31-35

10. Groner W, Johnson A, Kanter R. Effects of storage Conditions and Anti-coagulants on the properties of Blood Cells Monitored by the Ektacytometer and Technicon H*1 System. XXI Congress of the International Society of Haematology 1986 639
11. Groner W. New Developments in Flow Cytochemistry Technology, In Symson E. Proceedings of the Technicon H*1 Hematology Symposium, Technicon Instruments Corporations. 1986 1-8
12. Harkins L, Sirel J, Mckay R, Wyllie R. Discriminant analysis of macrocytic red cells. Clin Lab Haemat 1994 16: 225-234
13. Jou JM, Aymerich M, Insa MJ, Vives Corrons JL. Evaluación del auto analizador hematológico H*1. XXVIII Reunión de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia. Salamanca. 1986
14. Jou JM, Vives Corrons JL, Insa MJ, Aymerich M, Pastor C, Reverter JC. A new discriminant index between thalassemia trait and iron deficiency anemia given by the Technicon H*1 analyzer, Xth Congress of International Society of Haematology. Jerusalem 1989 102
15. Jou JM, Vives Corrons JL, Insa MJ, et al. Evaluación del sistema automatico Technicon H-600 para la realización del hemograma y el recuento diferencial leucocitario. Sangre 1984 29:73-86
16. Kawarabayashi K, Tsuda I, Tatsumi N, Okuda K. Leukemic blasts detected by the Technicon H*1 blood cells counter. Am J Clin Pathol 1987 88: 624-627
17. Kershaw GW, Robin H. Evaluation of the Technicon H*1 Hematology Analyzer. Pathology 1987 66: 473-478
18. Kim YR, Martin G, Paseltiner L, Ansley H, Ornstein L, Kanter RJ. Subtyping Lymphocytes in peripheral Blood by Immunoperoxidase labeling and light scatter/Absorption Flow Cytometry. Clin Chem 1985 31: 1481-1486

19. King R. Normal Range and correlation studies for the selected Red Cell Parameters on the Technicon H*1 System. In Simson, E. Proceedings of the Technicon H*1 Haematology Symposium. 1986 39-44
20. Koss LG, Czerniak B, Herz F, Wersto R. Flow cytometric measurements of DNA and other cell components in human tumors: A critical appraisal. *Hum. Pathol.* 1989 20: 528-548
21. Lai AP, Martin PJ, Richards JDM, Goldstone AH, Cawley JC. Automated leukocyte differential counts in acute leukemia: a comparison of the Hemalog D, H-6000 and Coulter S-Plus IV. *Clin Lab Haematol* 1986 8: 33-41
22. Lanza F, Castoldi GL. Automated Flow cytochemistry measuring chronic lymphocytic leukemia and healthy adult cells. *Blut* 1986 53: 59-60
23. Marcelo H, Faulhaber W, DA C M, Sanchez S. Fluxocitometria na rotina laboratorial: análise hematológica automatizada. *Rev. Bras. Pat Clí* 1989 85-94
24. Mohandas N, Kim YR, Tycko DH, Odilk J, Wyatt J, Groner W. Accurate and independent measurement of volume and hemoglobin concentration of individual red cells by laser light scattering. *Blood* 1986 68: 506-513
25. Mohandas N. Inaccuracies Associated with the Automated Measurement of MCHC in Dehydrated Cells. *Blood* 1980 56: 125
26. Orfao A, Ciudad J, González M, López A, Abad MM, Paz Bouza JI, Cruz JJ, Gómez Alonso A, San Miguel JF. Flow cytometry in the diagnosis of cancer. *Scand J Lab Med*, 1995
27. Orfao A, Ciudad J, Marcedo A, Martínez A, López Berges MC, Vidrales B, Valverde B, San Miguel JF. Contribución del inmunofenotipo al estudio de la enfermedad mínima residual. *Sangre* 1994 39:(supl. 1): 38-41

28. Orfao A, González M, Ciudad J, López Berges MC, López A, San Miguel JF, López Borrasca A. Aplicaciones de la Citometría de Flujo en el diagnóstico hematológico. *Biología y Clínica Hematología* 1992 14: 193-203
29. Orfao A, Ruiz Argüelles A. Citometría de flujo y su aplicación en hematología. En "Citometría de flujo", *Enciclopedia Iberoamericana de Hematología*. Ediciones Universales de Salamanca. 1993 161-175
30. Orfao A, Ruiz Argüelles A, Lacombe F, Ault K, Basso G, Danova M. *Flow cytometry: its applications to Haematology*. Haematologica, 1995
31. Rilley RS, Mahin EJ. *Flow cytometry. Clinical applications*. Seattle, Washington. ASCP 1989 Workshop #9072
32. Ross DW, Bently SA. Evaluation of an automated hematology system (Technicon H*1). *Arch Path Lab Med* 1986 110: 803-808
33. San Miguel JF, Gonzalez M, Orfao A, Lopez Borrasca A. Inmunopatología de leucemias y linfomas. *MTA Medicina Interna* 1988 vol. VI (nº1): 9-46
34. Saw D, Tham K. Clinical Application of an Automated Haemat Analyser *Jour of the Hong Kong Med Assoc* 1988 40:3 219-22
35. Technicon Staff. El H*1 y las Plaquetas. *Autoanálisis* 1988 3: 12-15
36. Theodorsen L. Automated cyanide-free method for haemoglobin determination on Technicon H*1 *Scan J Clin Lab Invest* 1990 50: 643-648
37. Theodorsen L. Haemoglobinometry on Automated haematology analyzers. *Clin Lab Haemat* 1987 9: 377-385
38. Tycko D, Metz M, Epstein E, Grinbaum A. Flow-cytometric light scattering measurement of red blood cell volume and hemoglobin concentration, *Applied Optic*: 1985 24: No.9 1355-1365

39. Vhinchilli VM, Martel JK, Kumanyika S, Lloyd T. The consultant's Forum, A Weighted Concordance correlation Coefficient for repeated Measurement Designs, Biometrics 1996 24: No.1 341-353
40. Watson JS, Davis RA. Evaluation of the Technicon H*1 Hematology System. Lab Med 1987 18: 316-322
41. Wheelless LL Jr. Flow instrumentation and data analysis. In Diagnostic Flow Cytometry. Coon JS, Weinstein RS. Williams & Wilkins. Baltimore 1991 17-34

13. ANEXOS

13.1 MUESTRAS DE VALORES BAJOS

LEUCOCITOS	MÉTODO TRADICIONAL	MICROMETODO	DIFERENCIA	RC
Media	4.69	4.33	0.36	
Varianza	0.62	0.50	0.22	0.87

GLÓBULOS ROJOS	MÉTODO TRADICIONAL	MICROMETODO	DIFERENCIA	RC
Media	4.97	4.82	0.16	
Varianza	0.25	0.18	0.08	0.93

HEMOGLOBINA	MÉTODO TRADICIONAL	MICROMETODO	DIFERENCIA	RC
Media	14.30	13.86	0.44	
Varianza	2.45	1.77	0.84	0.99

HEMATOCRITO	MÉTODO TRADICIONAL	MICROMETODO	DIFERENCIA	RC
Media	44.27	43.96	0.32	
Varianza	27.60	24.75	6.94	0.99

PLAQUETAS	MÉTODO TRADICIONAL	MICROMETODO	DIFERENCIA	RC
Media	247.46	232.20	15.26	
Varianza	7490.85	5214.04	1571.71	0.97

NEUTROFILOS	MÉTODO TRADICIONAL	MICROMETODO	DIFERENCIA	RC
Media	46.90	47.62	-0.72	
Varianza	65.79	101.69	12.57	0.99

LINFOCITOS	MÉTODO TRADICIONAL	MICROMETODO	DIFERENCIA	RC
Media	37.41	36.18	1.22	
Varianza	131.69	153.10	16.37	0.99

13.2 MUESTRAS DE VALORES NORMALES

LEUCOCITOS	MÉTODO TRADICIONAL	MICROMETODO	DIFERENCIA	RC
Media	6.79	6.47	0.32	
Varianza	0.80	0.61	0.12	0.92

GLÓBULOS ROJOS	MÉTODO TRADICIONAL	MICROMETODO	DIFERENCIA	RC
Media	4.68	4.55	0.12	
Varianza	0.20	0.21	0.06	0.95

HEMOGLOBINA	MÉTODO TRADICIONAL	MICROMETODO	DIFERENCIA	RC
Media	13.88	13.39	0.49	
Varianza	1.70	1.60	0.57	0.91

HEMATOCRITO	MÉTODO TRADICIONAL	MICROMETODO	DIFERENCIA	RC
Media	42.11	41.76	0.35	
Varianza	17.58	15.05	2.30	0.99

PLAQUETAS	MÉTODO TRADICIONAL	MICROMETODO	DIFERENCIA	RC
Media	263.20	244.76	13.44	
Varianza	9067.09	9192.54	3763.26	0.98

NEUTROFILOS	MÉTODO TRADICIONAL	MICROMETODO	DIFERENCIA	RC
Media	61.33	60.93	0.40	
Varianza	98.83	112.17	28.08	0.99

LINFOCITOS	MÉTODO TRADICIONAL	MICROMETODO	DIFERENCIA	RC
Media	27.87	27.98	-0.12	
Varianza	77.64	70.86	12.0	1.00

13.2 MUESTRAS DE VALORES ALTOS

LEUCOCITOS	MÉTODO TRADICIONAL	MICROMETODO	DIFERENCIA	RC
Media	10.51	9.83	0.67	
Varianza	0.53	0.51	0.12	0.99

GLÓBULO ROJOS	MÉTODO TRADICIONAL	MICROMETODO	DIFERENCIA	RC
Media	4.94	4.83	0.11	
Varianza	3.62	3.95	0.40	0.98

HEMOGLOBINA	MÉTODO TRADICIONAL	MICROMETODO	DIFERENCIA	RC
Media	14.83	14.45	0.38	
Varianza	3.62	3.95	0.40	0.98

HEMATOCRITO	MÉTODO TRADICIONAL	MICROMETODO	DIFERENCIA	RC
Media	44.80	44.59	0.21	
Varianza	31.58	28.71	2.60	0.99

PLAQUETAS	MÉTODO TRADICIONAL	MICROMETODO	DIFERENCIA	RC
Media	256.18	253.83	2.35	
Varianza	12329.94	13206.76	212.59	0.99

NEUTROFILOS	MÉTODO TRADICIONAL	MICROMETODO	DIFERENCIA	RC
Media	58.88	60.84	-1.97	
Varianza	104.65	143.28	142.15	0.96

LINFOCITOS	MÉTODO TRADICIONAL	MICROMETODO	DIFERENCIA	RC
Media	29.07	29.62	-0.54	
Varianza	105.57	83.69	18.04	0.99

94C
7/1/11

BR. GUSTAVO ADOLFO RENDÓN OLIVA
TESISTA

Oscar Alvarez Gill

LIC. OSCAR ALVAREZ GILL
ASESOR

Heidi Elke Logemann Lima

LIC. HEIDI ELKE LOGEMANN LIMA
DIRECTORA

Hada Marieta Alvarado Beteta

LIC. HADA MARIETA ALVARADO BETETA
DECANA