

Automatización en Hematología: Actualización y Revisión

Romero Artaza Jorge N., Díaz de Domingo Norma B.

*Dpto. de Bioquímica Clínica.. Facultad de Farmacia y Bioquímica.
Laboratorio de Hematología. Hospital de Clínicas "José de San Martín". UBA.*



ACTUALIZACIÓN EN EL LABORATORIO HEMATOLÓGICO

HEMATOLOGIA, Vol. 4 N° 1: 35-37
Enero-Abril, 2000

INTRODUCCIÓN:

Los recuentos celulares realizados en forma "manual" están siendo reemplazados por recuentos "automatizados" o "semiautomatizados", efectuados por contadores hematológicos que emplean diversas tecnologías o la sumatoria de ellas para lograr su cometido. Muchos tipos de autoanalizadores han sido utilizados en los laboratorios de hematología en los últimos treinta años, éstos han evolucionado de los modelos semiautomáticos (con dilución previa en forma externa de la muestra) hasta los actuales que cuentan con instrumentos totalmente automatizados que brindan una información que en algunos casos incluye recuento de reticulocitos al mismo tiempo que realiza los recuentos celulares, calcula los valores hematimétricos y la fórmula leucocitaria relativa. Es el objeto de este artículo realizar un comentario de las tecnologías actuales y compararlas con los métodos tradicionales, a fin de analizar las respectivas ventajas y desventajas de cada uno de estos procedimientos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El primer punto a considerar es la toma de la "muestra" a analizar. El paciente deberá tener como mínimo cuatro horas de ayuno para el hemograma ya que de no ser así puede interferir en las determinaciones, sobre todo en la hemoglobina (al producirse turbidez se falsea el resultado, ya que lo que se mide es absorbancia). Según la determinación a efectuar se deberá seleccionar el anticoagulante a utilizar ya que no todos ejercen su acción de la misma manera, por ejemplo: si deseamos realizar recuentos celulares, el anticoagulante de elección es el K₂EDTA o Na₂EDTA (sal disódica o dipotásica del etilen-diaminotetracético) en una proporción de 1,5-2,2mg/ml que al ac-

tuar como quelante del Ca²⁺ produce una anticoagulación completa con efecto mínimo sobre las células, incluso sobre las plaquetas. Sin embargo hay que considerar la llamada **Pseudo-trombocitopenia debida al EDTA**, en la cual el paciente afectado posee un Anticuerpo plaquetario dependiente de EDTA que es activo solo "in vitro". El Ac (IgG o IgM) reacciona con Ag ocultos "crípticos" sobre las GPIIb/IIIa, las cuales son expuestas debido a cambios conformacionales en el complejo causado como consecuencia de la remoción del Ca²⁺ por el anticoagulante. El Ac causa aglutinación plaquetaria en la muestra anticoagulada con EDTA, que se asocia con grandes acúmulos plaquetarios en el frotis o satelismo alrededor de los neutrófilos, que produce un recuento falsamente disminuido por parte de los contadores hematológicos. En estos casos, se recomienda: cambiar el anticoagulante a "Citrato" por ej., o directamente evaluar las plaquetas a partir del extendido de sangre sin anticoagulante. Si se tiene en cuenta estas alteraciones se puede considerar al EDTA como el anticoagulante de elección. Las muestras deberán ser analizadas hasta 6 hs. después de la extracción a Temperatura Ambiente (TA) o hasta 24 hs. mantenidas a 4°C las cuales deben ser llevadas a TA antes de su procesamiento en el autoanalizador.

Existen dos metodologías automatizadas para los recuentos celulares: Resistencia Electrónica o Impedancia y el principio de Light Scattering o de contadores ópticos por laser. Actualmente existen instrumentos que conjugan en un mismo contador ambas y se podría agregar una tercera que es la fluorescencia la cual convertiría al contador hematológico en casi literalmente un citómetro de flujo permitiendo realizar incluso estudios de viabilidad celular, recuento directo de eritroblastos y reticulocitos inmaduros. En el primer caso: "impedancia" las células a contar son obligadas a pasar por un orificio o ventana de un determinado diámetro que además posee dos electrodos a los costados, lo que generan un campo eléctrico constante que se altera con el pasaje de las células (malas conductoras de la electricidad) generando impulsos (número) y amplitud (tamaño) de la señal. En otras palabras estos contadores poseen dos canales, uno para recuento de glóbulos blancos(WBC) y determinación deHb (por el método de

Drabkin) y otro para recuento de glóbulos rojos(RBC) y plaquetas. A su vez también por tamaño brindan un recuento leucocitario diferencial "tentativo" de tres sub-poblaciones: **Lyn:** linfocitos pequeños y medianos, **Mid:** monocitos, eosinófilos y basófilos y **Gran:** granulocitos neutrófilos y eosinófilos también (las diferencias de tamaño se logran por cambios en la permeabilidad celular gracias a la acción del líquido diluyente: isotón).

Los contadores que se basan en light scatter para el recuento celular hacen pasar las células en fila a través de un orificio y las impactan con un haz de luz coherente (láser), el cuál según el tipo celular, granulación, etc, dispersa la luz en un determinado ángulo que es utilizado para su identificación (por ej. se las impacta a 0, 30 y 90°). A su vez, se las clasifica según tipo de granulación: neutrófila, eosinófila (repolariza la luz polarizada) y basófila, densidad y complejidad nuclear: linfocitos menos complejos a neutrófilos más complejos.

En algunos instrumentos, se usan reacciones citoquímicas específicas (Ej. Reacción de Peroxidasas) para caracterizar poblaciones celulares.

RESULTADOS

Analizando cada uno de los componentes del hemograma podemos obtener los siguientes resultados: El **Hematocrito:** realizado en forma manual "microcapilar", (8 min a 12.000 g) debido a la centrifugación produce un "trapping" de plasma el cual redundará en 1 a 2 puntos más al obtenido por cálculo en los contadores hematológicos (a partir del VCM y del recuento de GR). El valor de **Hemoglobina** es obtenida en ambos casos por el método de Drabkin o de la cianometahemoglobina que es el recomendado por el International Committee for Standardization in Haematology, por lo tanto ambas metodologías son comparables. **Recuento de leucocitos:** en forma manual: el error está relacionado con el número de células contado en cámara de Neubauer. Si se considera que cuanto más células se cuentan menor error se produce, el contador hematológico al contar mayor número de células en menor tiempo genera un error menor. No obstante, se puede decir que ambos métodos son comparables.

Fórmula leucocitaria relativa: como se dijo anteriormente los autoanalizadores que utilizan "impedancia" proporcionan un recuento diferencial aproximado que correlaciona bien con el obtenido en el frotis de sangre periférica en los casos "normales", los que se basan en light scatter aprovechando varias propiedades como por ej: ángulo de desviación de la luz, repolarización, densidad de la granulación citoplasmática y complejidad nuclear que brindan recuentos diferenciales bastante aceptables. El agregado de alarmas permite detectar anomalías (blastos, inmunocitos, clumps plaquetarios, inclusiones eritrocitarias, etc) que deberán ser confirmadas con la ob-

servación directa del frotis de sangre periférica. El problema que se presenta es el número de células que cuentan los analizadores (10.000) en relación al contado (100) al realizar el estudio del extendido de sangre, esto acarrea divergencias porque desplaza los valores "normales" del inconsciente colectivo hematológico (basófilos: 1-2%, Monocitos: 4-8%) hacia valores mayores, en ese caso se deberán redefinir los rangos de "normalidad" según la metodología empleada. **Recuento de Eritrocitos:** el conocerlo es útil en sí mismo pero lo es más aún porque permite conocer el VCM, el HCM y el Hto que en los autoanalizadores se obtiene por cálculo a partir del RBC debido al error inherente del método manual en cámara. El método de referencia es el automatizado (número de partículas que atraviesan un campo eléctrico) más que la cantidad de GR contados visualmente en cámara de Neubauer. De esa manera adquieren relevancia en la tipificación inicial de las anemias el VCM, HCM y el CHCM; sumado a otros nuevos parámetros que brindan los autoanalizadores, como por ej el RDW (Red distribution Width) o índice de anisocitosis VN: 13,0-14,0% establecido para la media poblacional en nuestro laboratorio tal que a mayor RDW mayor anisocitosis. El mismo también puede ser utilizado por ej en la diferenciación tentativa "a priori" entre anemia ferropénica y talasemia menor. El HDW o índice de anisocromía de utilidad en por ej: target cells y las curvas de distribución celular "histogramas" que en el caso de la serie roja nos informa por ej. si el paciente responde o no a una terapia de reemplazo o agente hemático presentando las típicas curvas bimodales en las que se observan dos poblaciones celulares conviviendo en un mismo individuo. Hay que mencionar la significación actual entre HCM y CHCM ya que históricamente se estableció que de los dos índices, era más representativo el CHCM ya que expresa el contenido de hemoglobina en relación al paquete eritrocitario. Actualmente, se considera que ya que la CHCM se calcula matemáticamente a partir de la Hb (dato medido) y el Hto (dato calculado) mientras que la HCM se obtiene a partir de la Hb (dato medido) y del RBC (dato medido también) por lo tanto el error cometido es menor. Así, de los valores obtenidos con autoanalizadores es más confiable la HCM.

El caso de los recuentos plaquetarios merece un párrafo aparte, aquí dispondríamos de tres alternativas: a) estimación de plaquetas en el frotis que requiere un buen entrenamiento y práctica especial pero falla en brindar un número preciso a valores altos o bajos, b) recuento en cámara húmeda (con sangre anticoagulada en tubo de plástico) demora más tiempo y generalmente se observan valores inferiores a los

obtenidos por extendido y c) recuento de plaquetas con el autoanalizador en el método de impedancia establece una ventana entre partículas de 2-20fl consideradas "plaquetas" y partículas mayores de 36fl consideradas "Glóbulos Rojos" con los consecuentes problemas de solapamientos que se producen en presencia de microcitos, esquistocitos (aumentan falsamente el número de plaquetas) y macroplaquetas o megaplaquetas que no son distinguidas como tales. Por otra parte, las plaquetas al ser hemicélulas se agregan y se adhieren a las superficies dificultando por lo tanto el recuento por parte del autoanalizador. Si se usa light scatter en lugar de impedancia mejora un poco los resultados. Hay que mencionar también valores hematimétricos para plaquetas suministrados por los autoanalizadores como el MPV (volumen plaquetario medio), PDW (similar al RDW en GR) y el plaquetocrito; éstos nuevos parámetros plaquetarios hacen necesario estudios más profundos para revelar su verdadera significación clínica. Se ha documentado que el PDW es de cierta utilidad en diferenciar trombocitemia esencial (curso con PDW elevado) de trombocitosis reactiva (curso con PDW normal).

Con respecto al recuento automatizado de reticulocitos en relación al método tradicional del azul brillante de cresilo, aquí también en el método automatizado se cuentan mayor número de células por lo que el resultado puede variar, algunos contadores requieren un tratamiento previo de la muestra antes de realizar el recuento (es más costoso) otros de última generación lo realizan en un solo paso utilizando fluorescencia (tiñe el RNA, posibilitando diferenciar reticulocitos maduros e inmaduros). Por el momento, el método manual se considera más práctico si se cuenta con un número bajo de muestras.

Merecen mencionarse algunos de los errores más comunes que se producen en los autoanalizadores en relación a las características de las muestras a estudiar:

Presencia de: a) microcitos y esquistocitos que pueden disminuir el recuento de GR y aumentar el plaquetario; b) Crioaglutininas: disminuye el recuento de GR y el Hto no así la hemoglobina, se debe calentar la muestra a 37°C y repetir el recuento; c) Eritroblastos: en "impedancia" aumentan falsamente el número de leucocitos. Los contadores que emplean light scatter e impedancia al mismo tiempo señalan su presencia con alarmas ya que detectan las diferencias en el recuento entre el WOC (recuento óptico) y el WIC (recuento por impedancia) más allá de los límites de tolerancia; d) Aglutininas plaquetarias que disminuyen el recuento plaquetario e incrementan falsamente el recuento leucocitario, lo mismo sucede con las crioglobulinas, etc.

CONCLUSIONES:

En líneas generales, las técnicas manuales son más laboriosas, menos precisas pero más económicas que las automatizadas ya que éstas brindan más información (hasta 26 parámetros) rápidamente. Es indudable que con el advenimiento de los contadores hematológicos totalmente automatizados se mejoró notablemente el diagnóstico inicial en la hemato-logía clínica proveyendo datos más confiables, precisos y en menor tiempo. Sin embargo, estos instrumentos deberán ser cuidadosamente **calibrados**, sometidos a rigurosos **controles de calidad** y de dispersión de datos; ser operados por personal idóneo en su manejo y entrenado en la interpretación de los datos informados. La observación del extendido sanguíneo debe ser realizado por profesionales capacitados que confirmarán o no lo señalado por los autoanalizadores, esta operación se debe considerar **imprescindible** para asignar verdadera validez a los resultados obtenidos del hemograma.

BIBLIOGRAFÍA

1. ICSH. Guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting and cell marker applications. *Clin and Lab Haematol* 1994; 16: 174-77.
2. Mohandas N., Clark MR, Kissinger S, Bayer C, Shobert SB. Inaccuracies associated with the automated measurement of MCHC in dehydrated cells. *Blood* 1980; 56: 125-128.
3. Ross D.W., Bentley SA. Evaluation of an automated hematology system (techniconH-1) *Arch Pathol Lab Med* 1986; 110: 803-8.
4. Bessman JD: Heterogeneity of red cell volume: Quantitation, clinical correlations, and possible mechanisms. *The Johns Hopkins Medical Journal* 1980; 146: 226-30.
5. Bessman JD, Gilmer PR, Gardner FH: Improved classification of anemias by MCV and RDW. *Am J Clin Pathol* 1983; 80: 322-9.
6. Lin CK, Lin JS, Chen SY et al: Comparison of hemoglobin and red blood cell distribution width in the differential diagnosis of microcytic anemia. *Arch Pathol Lab Med* 1992; 116: 1030-32.
7. Van Zeben D, Bieger R, Van Wermskerken R et al: Evaluation of microcytosis using serum ferritin and red blood cell distribution width. *Eur J Haematol* 1990; 44: 106-9.
8. Roberts GT and El Badawi SB. Red blood cell distribution width index in some hematologic diseases. *Am J Clin Pathol* 1985; 83: 222-6.
9. Flynn MM, Reppun TS, Bhagavan NV: Limitations of red cell distribution width (RDW) in evaluation of microcytosis. *Am J Clin Pathol* 1986; 85: 445-9.
10. Hammersley MW, King RV, Sillivant RE, et al: High erythrocyte distribution values and possibilities of hemoglobinopathies, *Am J Clin Pathol* 1981; 75: 370-2.
11. Harkins LS, Sirel JM, Mc Kay PJ, Wylie RC, Titterington DM, Rowan RM. Discriminant analysis of macrocytic red cells, *Clin Lab Haematol* 1994; 16 (3): 225-34.
12. Anderson SJ. Abbott Diagnostics: Software Update Revision K, version 1.32. March 1994. Update Kit list No. 04B28-01.
13. Hillman RS, Finch CA. The misused reticulocyte, *Br J Haematol* 1969; 173: 310-315.