



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NÚCLEO DE SUCRE  
ESCUELA DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

COMPARACIÓN DEL CONTAJE PLAQUETARIO, EMPLEANDO DIFERENTES  
METODOLOGÍAS, EN PACIENTES CON PÚRPURA TROMBOCITOPÉNICA  
Y SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS  
(Modalidad: Tesis de Grado)

NORIELIS DEL CARMEN ZABALA GARCÍA

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADA EN BIOANÁLISIS

CUMANÁ, 2012

COMPARACIÓN DEL CONTAJE PLAQUETARIO, EMPLEANDO DIFERENTES  
METODOLOGÍAS, EN PACIENTES CON PÚRPURA TROMBOCITOPÉNICA  
Y SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS

APROBADO POR:

---

Profa: Erika Hannaoui  
Asesora

---

Profa: Yelixse Navarro  
Coasesora

---

---

# ÍNDICE

DEDICATORIA .....	i
AGRADECIMIENTO .....	ii
LISTA DE TABLAS .....	iii
RESUMEN .....	iv
INTRODUCCIÓN .....	1
METODOLOGÍA .....	10
Población .....	10
Recolección de las muestras .....	10
Realización de frotis sanguíneo .....	11
Método manual directo para contaje plaquetario (Brecher y Cronkite) .....	11
Métodos automatizados para contaje plaquetario .....	11
Análisis estadístico .....	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	13
CONCLUSIONES .....	21
RECOMENDACIONES .....	22
BIBLIOGRAFÍA .....	23
APÉNDICES .....	27
ANEXOS .....	31
HOJAS DE METADATOS .....	32

## DEDICATORIA

A

Dios Todopoderoso, mi pilar, mi guía, mi pastor.

Mis abuelos y bisabuelos, gran ejemplo de lucha, superación, amor, fe, perseverancia y humildad.

Mis padres, Nori y Leonardo por su amor y apoyo incondicional. Gracias a ustedes hoy soy quien soy.

Mi hermana Norielkys, simplemente por ser el mejor regalo de mi vida.

Mis tías, tíos, primas y primos, por formar una familia espléndida, única e incomparable.

Andreína Marcano, Ilmimar Meza y María D'Arthenay, por estar a mi lado durante estos años en los momentos de alegrías, tristezas, triunfos y fracasos. Más que amigas son mis hermanas, gracias a ustedes el camino fue una aventura maravillosa.

María Blanco, por su amor y recibirme en su hogar como una madre.

Nizzar Gharzeddine, por el amor y cada momento compartido. Gracias a ti, encontré una inesperada felicidad.

Amine Gharzeddine, por el cariño y la confianza brindada.

Mis ángeles de la guarda, por guiarme con sus enseñanzas y motivarme a ser cada día mejor.

## **AGRADECIMIENTO**

A

Erika Hannaoui, por ser una excelente profesora y guía. Gracias por motivarme y estar allí, siempre optimista y con una respuesta.

Todo el personal de la consulta de hematología, laboratorio de banco de sangre y el Sr. Francisco del departamento de estadística del HUAPA, por su buena disposición y brindarme toda la ayuda necesaria para llevar a cabo este trabajo.

Al personal del laboratorio RENTAL Sucre y Abreu, por proporcionarme la información, la asistencia y su espacio físico para el desarrollo de este trabajo.

Todas aquellas personas que a lo largo de esta carrera, colaboraron a alcanzar esta gran meta.

## LISTA DE TABLAS

1.

Tabla 1. Comparación del conteo plaquetario en pacientes con púrpura trombocitopénica, síndromes mielodisplásicos y grupo control provenientes de la consulta de hematología del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”..... 13

Tabla 2. Comparación del recuento plaquetario en pacientes con púrpura trombocitopénica, síndromes mielodisplásicos y grupo control provenientes de la consulta de hematología del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”..... 14

Tabla 4. Análisis de correlación entre el conteo plaquetario manual y la técnica automatizada (impedancia, citometría de flujo y combinada), realizado en pacientes con púrpura trombocitopénica, provenientes de la consulta de hematología del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” ..... 18

## RESUMEN

Se valoró el conteo plaquetario de tres grupos de pacientes, de acuerdo al método manual de Brecher y Cronkite y automatizado, usando analizadores hematológicos con diferentes principios: Swelab ALFA (impedancia), Cell-dyn 3200 (citometría de flujo) y Beckman Coulter LH 500 (impedancia volumétrica, radiofrecuencia y dispersión de la luz láser); en individuos con púrpura trombocitopénica (PT) y síndromes mielodisplásicos (SMD), provenientes de la consulta de hematología del Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá" de la ciudad de Cumaná. Para tal fin, se tomaron muestras de sangre a pacientes de ambos sexos, con edades comprendidas entre 15 y 50 años, ya diagnosticados con dichas enfermedades. Asimismo, se tomaron 20 individuos procedentes de la consulta antes mencionada, sin alteración del número de plaquetas como grupo control. Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y correlación a un 95% de confiabilidad, arrojando diferencia significativa en los pacientes con PT y SMD tanto por el método manual como por los distintos automatizados ( $p < 0,05$ ) y una correlación positiva; en cambio, en el grupo control no se obtuvieron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Tomando en cuenta los resultados obtenidos, se pueden considerar como válidos los recuentos realizados por los diversos métodos, tanto para pacientes con un conteo de plaquetas dentro del rango de referencia, como por debajo del mismo.

## INTRODUCCIÓN

La plaqueta, es un fragmento citoplasmático del megacariocito, mide de 2-4  $\mu\text{m}$  de diámetro, circula en la sangre periférica y participa tanto directa como indirectamente, en el mecanismo de la coagulación de la sangre. Se tiene como elemento clave de la hemostasia primaria, debido a que su actividad se asocia básicamente a la activación por contacto. Su número y distribución en sangre periférica está finamente controlado así como su destrucción, la cual se produce a través de un proceso cuidadosamente predeterminado (Pérez, 1995).

Los hallazgos de Bizzozero realizados entre 1881 y 1882, permitieron el reconocimiento del papel de las plaquetas en la hemostasia y constituyeron la base inicial de los estudios que han dado lugar a los conocimientos hoy existentes. Asimismo, las plaquetas intervienen en otro tipo de procesos fisiológicos o patológicos, como la inflamación, la cicatrización de heridas, la trombosis, la aterosclerosis y las metástasis tumorales (Crawford y Scrutton, 1987).

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) son un grupo de trastornos clonales en los cuales hay una proliferación y maduración de las células hematopoyéticas, morfológica y funcionalmente anormal, además de ineficaz. Como consecuencia, se presenta citopenia en al menos una línea celular y también anomalías morfológicas en las células en sangre periférica y en médula ósea (Fundora, 1999). En un 85% de los casos de SMD es común encontrar anemia acompañada por macrocitosis moderada; asimismo, se pueden encontrar eliptocitos, esquistocitos, punteado basófilo y hasta el 10 % de células rojas nucleadas. Estas alteraciones reflejan una eritropoyesis anormal (comúnmente hiperplásica) con alteraciones estructurales citoplasmáticas, entre las que se destacan la presencia de vacuolas y la basofilia intensa, alteraciones nucleares e incremento del número de eritroblastos hasta en el 50%. Esto



conlleva, a un desbalance entre la proliferación y diferenciación eritroide y la apoptosis. El recuento de reticulocitos habitualmente está bajo, aunque en ocasiones hay reticulocitosis que no excede el 10% en ausencia de hemólisis por autoinmunidad (Fernández y Hernández, 1999).

De igual manera, es frecuente encontrar en sangre periférica, neutropenia acompañada de hipolobulación, con aparición de formas pelgeroides (pseudopelger) y de hipogranulación, con el consiguiente defecto funcional de estas células. Otras anomalías incluyen la presencia de células con núcleos en anillos y otras alteraciones nucleares, estas últimas más frecuentes en la dismielopoyesis secundaria. En médula ósea, las células granulopoyéticas usualmente están aumentadas en número y se reafirma la existencia de granulación mixta y la persistencia de la basofilia citoplasmática con distribución irregular de ésta (Mckenzie, 2000).

La trombocitopenia está presente en el 30% de los casos en el momento del diagnóstico y puede preceder hasta en 10 años a la confirmación del SMD. Las plaquetas suelen ser gigantes, anormalmente alargadas e hipogranulares o con granulación central (Fernández y Hernández, 1999). Desde el punto de vista funcional, se conoce que las plaquetas en los SMD presentan defectos como la disminución de la adhesión, de la liberación y/o de la agregación (Rasi y Lintula, 1986). La megacariopoyesis frecuentemente está aumentada a expensas de megacariocitos pequeños; las alteraciones más comunes son las referidas a la lobulación nuclear. La dismegacariopoyesis en médula ósea, está presente en más de la mitad de los pacientes en el momento del diagnóstico y se plantea que la combinación de formas pelgeroides con micromegacariocitos puede ser considerada un marcador específico de SMD (Ruiz y cols., 2006)

Se estima que la incidencia de SMD es de 4 - 12 por cada 100 000 personas por año, y puede llegar hasta 30 por cada 100 000 personas, en los individuos

mayores de 70 años. La aparición en la edad pediátrica y en el adulto joven es rara y con poca frecuencia se han descrito algunos casos de SMD familiar. Además, se ha señalado cierto predominio en el sexo masculino, con una proporción de 1:5 y no se ha encontrado relación con la raza. La etiología es generalmente desconocida, aunque se sabe que el 20% de los SMD son secundarios al empleo de drogas antineoplásicas, entre las que sobresalen los agentes alquilantes, las epipodofilotoxinas y las antraciclinas; al contacto con productos químicos, fundamentalmente los derivados del benceno; a la exposición a radiaciones ionizantes y más recientemente se plantea que el hábito de fumar aumenta el riesgo de padecer SMD. En la infancia su aparición se asocia con la existencia de enfermedades constitucionales (Fernández y Hernández, 1999).

Las manifestaciones clínicas en los pacientes afectados por estos síndromes generalmente son consecuencia del grado de citopenia existente. Los síntomas más frecuentes incluyen fiebre, sangramiento y aquéllos que dependen de la anemia. Un elemento fundamental en el diagnóstico son las alteraciones morfológicas cualitativas en una o más series hematopoyéticas que aparecen tanto en sangre periférica como en médula ósea y deben estar presentes, como mínimo, en el 10% de las células de cada una de las series (Pérez, 1995).

La púrpura trombocitopénica (PT) es una enfermedad autoinmune, caracterizada por un bajo recuento de plaquetas (menor a  $100,00 \times 10^9/l$ ) y sangrado mucocutáneo (Douglas y cols., 2002). La producción insuficiente de plaquetas es explicable en la mayoría de los casos de pacientes con PT, por la disminución del número de megacariocitos en médula ósea, lo cual ocurre más frecuentemente por la supresión de los compartimientos de células madres o de megacariocitos y por el deterioro de la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN), como consecuencia, la médula ósea suele contener gran cantidad de megacariocitos anormales con núcleos deformados en forma de pesas (Rodak,

2004). En los casos de déficit severo de vitamina B12 y ácido fólico no sólo se implica la trombocitopenia por producción ineficiente, sino, que también se ha observado disminución de la sobrevida plaquetaria y megacariopoyesis inefectiva (Pérez, 1995).

La PT en algunos pacientes es producida por un proceso inmune, en el cual los anticuerpos generados se adhieren a las plaquetas y, las células del sistema mononuclear fagocítico, eliminan de la circulación estos complejos, sobretodo en el bazo. La vida media de las plaquetas se acorta de 7 a 10 días, a pocas horas y la rapidez con la cual son eliminadas de circulación, se correlaciona con el grado de trombocitopenia. El factor que produce trombocitopenia en el plasma del paciente es una inmunoglobulina G (IgG) que puede eliminarse del suero mediante la adsorción de plaquetas humanas normales. Los epítomos sobre las plaquetas, las glucoproteínas IIb y IIIa, son los blancos más comunes para los autoanticuerpos en PT; asimismo, los epítomos sobre las glucoproteínas también se identifican como blanco. Sin embargo, se desconoce la estimulación antigénica exacta y el modo de destrucción de las plaquetas (Rodak, 2004).

Otros mecanismos causantes de PT que se encuentran implicados con el sistema inmune son: a) En las situaciones en las cuales se forma trombina intravascular, que da lugar a la formación de fibrina y a la activación fragmentaria de plaquetas. b) Después de lesiones del endotelio vascular sanguíneo, de manera que las plaquetas se activan por contacto de superficie con el colágeno subendotelial. c) Infiltración de la médula ósea por células malignas con una disminución progresiva de los megacariocitos, a medida que las células anormales reemplazan los elementos medulares normales. Estas células anormales pueden producir inhibidores de la trombopoyesis que ayudan a determinar la trombocitopenia (McKenzie, 2000). La PT tiene mayor incidencia en mujeres que en hombres, con una relación de 3:1. La

presentación clínica tiene generalmente un comienzo insidioso, lento e historias de equimosis fáciles. Las manifestaciones en piel están dadas por petequias y hematomas, fundamentalmente, en las partes declives del cuerpo, en áreas de presión y en zonas donde existe o ha existido recientemente éxtasis venoso. En la mucosa oral se observan petequias y hematomas submucosos grandes y friables; éstos últimos, son característicos de sangramiento por trombocitopenia severa (Flores y Orna, 2010).

En la mayoría de los casos, la cantidad de plaquetas se halla entre  $30$  y  $80 \times 10^9/l$ . Sin embargo, los pacientes con PT sufren periodos de remisión y exacerbación, y el recuento plaquetario puede variar de valores normales a menos de  $20 \times 10^9/l$  durante dichos periodos. Desde el punto de vista morfológico, las plaquetas parecen normales, aunque más grande de lo habitual. Esto se refleja en una media del volumen plaquetario mayor, determinado por contadores celulares electrónicos. La médula se caracteriza por hiperplasia megacariocítica. Los megacariocitos tienen un tamaño aumentado y con frecuencia se observan formas jóvenes con núcleos únicos, contorno liso y menor cantidad de citoplasma. Cuando no hay sangrado, infección u otro trastorno subyacente, los precursores de eritrocitos y leucocitos son normales en cantidad y morfología. Las anomalías en las pruebas de coagulación se observan en aquellas dependientes de la función plaquetaria, como el tiempo de sangría y la retracción del coágulo. En la mayoría de los pacientes con PT los niveles de IgG asociados con las plaquetas, se encuentran elevados (Rodak, 2004)

Realizar el conteo plaquetario es indispensable en éstas y otras patologías, siendo uno de los análisis más solicitados por los médicos de manera rutinaria; para ello, los laboratorios clínicos pueden utilizar métodos automatizados o manuales, éstos últimos presentan la desventaja de requerir mucho tiempo y depender de la habilidad del analista (Knoll, 2000). Entre los métodos

manuales, se encuentra el creado por Brécher y Cronkite en 1950, el cual se basa en la determinación de las plaquetas en una cámara de Neubauer, tras dilución de la sangre (1/100) con oxalato de amonio ( $C_2H_8N_2O_4$ ) al 1% (lisis de eritrocitos), obteniendo así el número de plaquetas/l (Leite y cols., 2007).

El primer método automatizado para el recuento de plaquetas, fue el patentado por Coulter en 1953, basado en el principio de impedancia (Sandhaus y cols., 2002). Los analizadores de impedancia diluyen la muestra en un medio eléctricamente conductible y pasan las células a través de una pequeña abertura entre dos electrodos. Un cambio en la impedancia eléctrica resulta proporcional al tamaño de la célula y se genera cada vez que una célula pasa por la apertura (Olsen y cols., 2004). Las limitaciones del método de impedancia son bien conocidas, e incluyen la incapacidad para distinguir las plaquetas de otras partículas que se superponen al rango de tamaño de las plaquetas, en particular, los eritrocitos fragmentados y microcíticos. Así como, interferencia de partículas y el "ruido electrónico" en el extremo inferior del espectro de tamaños. Los "ajustes de curvas" y "umbral en movimiento", son los algoritmos informáticos que se han aplicado a los métodos de impedancia para corregir las interferencias y mejorar la precisión de los recuentos de plaquetas basados en dicho método. Estudios indican que los métodos para cuantificar plaquetas realizados mediante el principio óptico pueden ser más exactos que los métodos de impedancia (Sandhaus y cols., 2002).

Los primeros trabajos basados en la técnica de citometría de flujo aplicada al estudio de las plaquetas, aparecieron a finales de la década de los 80 (Caunedo, 2004), y la introducción por Shattil y cols. (1987) de dicha técnica para el estudio de la sangre, fue un paso fundamental para su aplicación clínica. En los equipos basados en citometría de flujo, coinciden tecnologías de vanguardia; tales como, la mecánica de fluidos, el láser, la óptica, la electrónica y la informática, que lo convierten en un equipo único, tanto desde el punto de

vista técnico, como funcional. Las células que serán examinadas, son suspendidas en el centro de un flujo de líquido isotónico que es impulsado a gran velocidad por un orificio estrecho y deben pasar a través de una fuente luminosa (láser) de forma secuencial (Caunedo, 2004). Al atravesar dicha fuente, las células interaccionan con la luz causando [dispersión](#) de la misma. Basándose en la [difracción](#) de la luz en sentido frontal, se puede evaluar el tamaño de las células y al medir la [reflexión](#) de la luz de manera lateral se evalúa la granularidad o complejidad de éstas (Navarrete, 2005). Estas señales luminosas son colectadas por detectores y transformadas en señales o impulsos eléctricos, los cuales se digitalizan pudiendo ser observados a través de los programas de computación especializados (Abbott diagnostics, 2004)

Además de la dispersión de la luz, si previamente a su análisis se le acopla a las células un fluorocromo a través de un anticuerpo monoclonal (AcMo) que reconoce una estructura específica de la misma, se pueden evaluar subgrupos específicos de plaquetas (Navarrete, 2005). En la actualidad existen equipos con diferentes detectores de fluorescencia, con los cuales pueden determinarse diferentes características que coexistan en determinadas poblaciones celulares. Además, la manipulación mínima de las muestras evita interferencias por activación [in vitro](#) y reduce las posibles pérdidas de subpoblaciones de plaquetas. Sin embargo, estos equipos son muy costosos, por lo que no se encuentran disponibles en la mayoría de los centros de salud (Caunedo, 2004)

La cuantificación de las plaquetas con los instrumentos automatizados incluye el recuento, la evaluación de su morfología a través del volumen plaquetario medio (VPM), y el ancho de distribución plaquetaria (ADP). Estos parámetros se obtienen al resuspender las células en una solución isotónica, y al pasar éstas por la apertura del instrumento, originan un cambio de voltaje proporcional a su volumen. A partir de histogramas se obtiene el VPM. Además, se utilizan relaciones matemáticas para obtener otros parámetros como, el plaquetocrito

(PCT), producto del valor de VPM y el recuento plaquetas. Todos estos parámetros se utilizan para estudios comparativos entre diferentes tipos de poblaciones y principalmente, para evaluar la integridad de la función trombótica (Salazar y cols., 1999). Cabe resaltar, que la variabilidad y falta de estandarización para el PCT y ADP, ha impedido que se puedan usar en el diagnóstico de rutina, siendo más empleados con fines investigativos (García, 2008). El VPM, es un parámetro que indica el tamaño plaquetario y está disponible en la mayoría de los autoanalizadores del mercado. Es un marcador indirecto de la activación y función plaquetaria, habiéndose observado buenas correlaciones con la agregación plaquetaria, síntesis del tromboxano, y liberación de  $\beta$ -tromboglobulina, función procoagulante y expresión de moléculas de adhesión. Los valores normales del VPM oscilan entre 8 y 11 fl, disminuyendo con la edad. In vitro se ha demostrado el aumento del VPM al activarse las plaquetas por la adición de agonistas (Molero y cols., 2002)

El contaje manual de Brecher y Cronkite desde 1984 era reconocido por varios autores como el estándar de oro o método de referencia, y hasta hace muy poco la calibración de los recuentos de plaquetas por los fabricantes de contadores automático de células y material de control de calidad se realizó por este método (Briggs y cols., 2000). Sin embargo, en el año 2001 la incorporación de la fluorescencia a la citometría de flujo permitió desarrollar un nuevo procedimiento para el recuento automático de plaquetas basado en su cuantificación a partir de sangre tratada con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), con un anticuerpo monoclonal dirigido contra antígenos de la membrana plaquetaria como, por ejemplo, la glucoproteína IIIa (CD61), seguida del análisis mediante citofluorometría. Dada la elevada fiabilidad de este procedimiento, la Sociedad Internacional de Laboratorio de Hematología (ISLH) lo recomendó como método de referencia para el recuento de plaquetas en sustitución del método óptico-manual mediante hemocitómetro (Vives y Aguilar, 2006).

Existen factores que contribuyen a los problemas de exactitud y precisión en el recuento de plaquetas tales como: las limitaciones tecnológicas del instrumento para eliminar interferencia celulares y partículas, la reproducibilidad insatisfactoria del recuento de plaquetas por medio de métodos manuales, y la interferencia preanalítica. La necesidad de analizadores hematológicos automatizados que produzcan recuentos exactos de plaquetas, particularmente en pacientes con PT y SMD, es imperativa, pues se trata de alteraciones potencialmente graves. Dada la importancia de este análisis para diversas patologías, resulta importante que el licenciado en Bioanálisis conozca la eficacia de los métodos empleados en el laboratorio, a fin de emplear la metodología que aporte mejores resultados. Por lo tanto, surgió la inquietud de valorar y comparar el contaje plaquetario por medio del método manual y automatizados más utilizados en la actualidad, y así aportar más información en este campo tan controversial de la hematología.



## **METODOLOGÍA**

### **Población**

Se estudiaron pacientes de ambos sexos, con edades comprendidas entre 15 y 50 años, que acudieron a la consulta de hematología del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” (HUAPA) de la ciudad de Cumaná, durante un período de tres meses en el año 2010. Se incluyeron en el estudio pacientes ya diagnosticados por el médico hematólogo con SMD, por medio de la anamnesis, examen físico, análisis de los parámetros hematológicos, frotis coloreados con ABC (1%), biopsia de médula ósea, niveles séricos de folato y vitamina B12. De igual manera, fueron incluidos pacientes ya diagnosticados con PT, por medio de la historia clínica del paciente, examen físico, hematología, análisis de extendidos sanguíneos coloreados con ABC (1%) y biopsia de médula ósea. Asimismo, se analizó un grupo conformado por 20 individuos, de ambos sexos, y en el mismo intervalo de edad, los cuales fueron usados como grupo control. Dichos individuos, se tomaron de la consulta antes mencionada para garantizar que no padecían ninguna patología que alterara la línea megacariocítica.

La presente investigación se realizó teniendo en consideración las normas de ética establecidas por la Organización Mundial de la Salud para trabajos de investigación en humanos en la declaración de Helsinki; documentos que han ayudado a delinear los principios de ética más pertinentes a la investigación biomédica en seres humanos (OPS, 2001) (Apéndice 1). Además, con su previo consentimiento, se le realizó una encuesta a los pacientes en estudio, a fin de obtener datos epidemiológicos y clínicos de interés para esta investigación (Apéndice 2).

### **Recolección de las muestras**

Se recolectaron muestras de sangre por punción venosa (5 ml) en tubos de

plástico con sal tripotásica del ácido etilendiaminotetraacético al 10% (EDTA-K<sub>3</sub>). La extracción de la muestra se llevó a cabo tomando en cuenta las medidas de bioseguridad e higiene pertinentes.

### **Realización de frotis sanguíneo**

Se tiñeron previamente láminas portaobjetos con el colorante ABC (1%). Luego, se procedió a tomar una gota de sangre con una laminilla pulida la cual se invirtió sobre la lámina portaobjetos coloreada (Arenas, 2000).

### **Método manual directo para conteo plaquetario (Brecher y Cronkite)**

Se mezcló cuidadosamente la muestra por inversión, a fin de homogeneizarla. Se tomaron 20 µl y se trasvasó al dispositivo Unopette previamente rotulado, el cual contenía 1,98 ml de oxalato de amonio (C<sub>2</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) tamponado al 1%. Luego de homogeneizar la mezcla, se procedió a llenar ambos retículos del hemocitómetro con la ayuda del capilar del dispositivo. Se dejó reposar durante 10 min en cámara húmeda, seguidamente se observaron en el microscopio con el objetivo de 40X y ocular 10X para contar las plaquetas en los 25 cuadrados medianos de cada retículo de la cámara. Valores de referencia: 140-400 x10<sup>9</sup>/l (Fragachán,1984)

### **Métodos automatizados para conteo plaquetario**

Se emplearon tres analizadores automatizados con diferentes principios para el conteo plaquetario, los cuales contaron con el control de calidad y calibración adecuada:

**Swelab ALFA:** basado en el principio de impedancia, para la realización de análisis hematológicos, a través del aumento de la resistencia producida cuando una célula sanguínea con baja conductividad pasa a través de un campo eléctrico. El número de intermitencias indica la cifra de células sanguíneas. De igual modo, proporciona información sobre VPM (Anexo 1).

Valores de referencia: PLT: 200 - 400 x10<sup>9</sup>/l VPM: 7,4 - 10,4 fl (Romero, 2009).

**Cell-dyn 3200:** utiliza la técnica de citometría de flujo para analizar las plaquetas, además, proporciona información sobre VPM. Este equipo realiza las determinaciones basadas en el principio de dispersión de luz, obtenidas de una célula sanguínea que pasa a través de un haz de luz láser (Anexo 2). Valores de referencia: PLT: 150 - 400 x 10<sup>9</sup>/l. VPM: 5,00 – 10,00 fl (Romero, 2009).

**Beckman Coulter LH 500:** combina las técnicas de impedancia volumétrica, radiofrecuencia y dispersión de la luz láser para el análisis de las diferentes líneas celulares, midiendo los parámetros antes mencionados simultáneamente de manera tridimensional. Asimismo, brinda resultado de VPM (Anexo 3). Valores de referencia: PLT: 200 - 500 x 10<sup>9</sup>/l. VPM: 7,0 – 12,0 fl (Coulter LH500 hematology analyzer, 2007).

### **Análisis estadístico**

Se aplicó un análisis de varianza y de correlación a un 95% de confiabilidad, para los valores de plaquetas obtenidos por los métodos empleados (manuales y automatizados), en los pacientes con SMD, PT y el grupo control (Sokal y Rohlf, 1981).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio, se evaluaron un total de 52 pacientes de ambos sexos y diferentes grupos etarios, diagnosticados con PT (20 pacientes) y SMD (12 pacientes) los restantes 20 individuos fueron usados como controles. En el grupo con SMD, se observó un predominio del sexo femenino con un 66,7% (8 pacientes) sobre el masculino con un 33,3% (4 pacientes), discordando con los revisados en la bibliografía, que señala una mayor incidencia en hombres que en mujeres (5:1) para esta patología (Fernández y Hernández, 1999).

A continuación, la tabla 1 muestra los resultados obtenidos del conteo de plaquetas por el método manual y el equipo automatizado con principio de impedancia.

Tabla 1. Comparación del conteo plaquetario en pacientes con púrpura trombocitopénica, síndromes mielodisplásicos y grupo control provenientes de la consulta de hematología del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”

Grupos	Principio del conteo plaquetario	Intervalo	$\bar{X}$	DS	F	p
PT	Manual	10-155	109,75	46,851	10,471	0,009*
	Impedancia	8-156	108,75	51,980		
SMD	Manual	30-235	95,83	74,430	68,237	0,003*
	Impedancia	22-226	93,17	61,532		
Control	Manual	205-425	286,55	70,805	20,347	0,002*
	Impedancia	213-410	275,45	61,539		

\*:  $p < 0,05$  (significativo);  $\bar{X}$ : media; DS: desviación estándar; F: Fisher; p: significancia; PT: púrpura trombocitopénica; SMD: síndromes mielodisplásicos

Para cada grupo en estudio, existe diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre el conteo manual y el automático por medio del principio de impedancia. Dicha diferencia, puede deberse a los errores que conllevan los diferentes pasos a realizarse por el método manual, lo cual hace que esta técnica posea un coeficiente de variación interlaboratorio del orden del 10 al

25% (Lewis y cols., 2008). De igual manera, una medición precisa y fiel de las plaquetas por el método de impedancia presenta inconvenientes con los fragmentos de glóbulos rojos (esquistocitos, microcitos, microsferocitos), de leucocitos (linfocitos linfomatosos, blastos mieloides o monocitoides), agregados lipídicos y proteicos (crioglobulinas) e incluso bacterias, ya que éstos son incluidos en el recuento por su tamaño similar a las plaquetas, sobreestimando el contaje principalmente en casos de trombocitopenia intensa al perderse la linealidad y aumentar el ruido de fondo (Molero y cols., 2010). Sin embargo, a pesar de estas limitaciones, el contaje plaquetario realizado por medio del principio de impedancia, resulta más preciso debido a que presenta un coeficiente de variación por debajo del 3% (Maya, 2007)

La tabla 2, muestran los resultados obtenidos de los contajes plaquetarios de los tres grupos en estudio, al analizarlos mediante la metodología manual y el equipo automatizado con principio de citometría de flujo.

Tabla 2. Comparación del recuento plaquetario en pacientes con púrpura trombocitopénica, síndromes mielodisplásicos y grupo control provenientes de la consulta de hematología del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”

Grupos	Principio del contaje plaquetario	Intervalo	$\bar{X}$	DS	F	P
PT	Manual	10-155	109,75	46,851	344,926	0,001*
	Citometría de flujo	19-155	109,52	48,810		
SMD	Manual	30-235	95,83	74,430	32,170	0,008*
	Citometría de flujo	30-271	107,50	78,762		
Control	Manual	205-425	286,55	70,805	3,098	0,109ns
	Citometría de flujo	223-430	311,55	58,138		

\*:  $p < 0,05$  (significativo); ns:  $p > 0,05$  (no significativo);  $\bar{X}$ : media; DS: desviación estándar; F: Fisher; p: significancia; PT: púrpura trombocitopénica; SMD: síndromes mielodisplásicos

Como se aprecia en la tabla 2, no existe diferencia significativa entre la técnica manual y automatizada con el principio de citometría de flujo al tratarse de

pacientes con un número de plaquetas en el rango de referencia. Sin embargo, al estudiar pacientes con un número de plaquetas disminuido ocurre lo contrario; en el grupo con PT se observó diferencia significativa, coincidiendo este resultado con los obtenidos por Latif y cols. (2003) que reportaron diferencias significativas para el conteo de plaquetas por el método manual y automatizado (usando un equipo con principio de citometría de flujo) en pacientes purpúricos. Asimismo, en el grupo con SMD se obtuvo diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ), esto pudo ser causado por interferencia preanalítica, tales como la agregación plaquetaria, que dificulta un recuento preciso de las plaquetas tanto por métodos manuales como automatizados (Sandhaus y cols., 2002).

La evaluación de los extendidos de sangre periférica coloreados con ABC al 1% permitió tener una mejor orientación sobre el número, distribución y morfología de las plaquetas. Al revisar los frotis pertenecientes a los pacientes purpúricos, se observaron plaquetas morfológicamente normales y en algunos casos aumentadas en tamaño. En el caso de pacientes con SMD, se observaron macroplaquetas, las cuales son características en esta patología (Fernández y Hernández, 1999).

La comparación estadística del conteo plaquetario llevado a cabo a través del método manual y automatizado con principio combinado, realizado en los tres grupos en estudio se muestran en la tabla 3. En dicha tabla se puede observar, que no se obtuvieron diferencias significativas en los pacientes del grupo control, contrario a los resultados arrojados para el grupo de pacientes con PT y SMD. Esta diferencia pudo ser causada por el tamaño de la muestra en estudio; así como por lo explicado por Kaplan y cols. (2001) los cuales exponen en su trabajo que debido a que muchos analizadores automatizados (incluyendo analizadores Coulter) utilizan el principio de impedancia eléctrica para determinar las plaquetas, cuentan restos celulares y eritrocitos pequeños o

fragmentados constituyendo las sustancias que interfieren. Estas partículas pueden ajustarse al tamaño de las plaquetas, y al mismo tiempo, plaquetas grandes pueden quedar fuera de este rango. Sin embargo, es importante reconocer que la precisión en los recuentos plaquetarios automatizados no solo se debe a la tecnología subyacente que se emplea para contar plaquetas, sino también a los algoritmos computarizados que han sido diseñados para evaluar los datos plaquetarios, minimizando las posibles interferencias que puedan presentarse en el conteo (Sandhaus y cols.,2002)

Tabla 3. Comparación del conteo plaquetario en pacientes con púrpura trombocitopénica, síndrome mielodisplásico y grupo control provenientes de la consulta de hematología del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”

Grupos	Principio del conteo plaquetario	Intervalo	$\bar{X}$	DS	F	p
PT	Manual	10-155	109,75	46,851	19,372	0,025*
	Combinado	13-156	106,30	55,689		
SMD	Manual	30-235	95,83	74,430	7,316	0,045*
	Combinado	30-228	105,33	77,321		
Control	Manual	205-405	286,55	70,805	1,767	0,275ns
	Combinado	203-430	317,90	71,282		

\*:  $p < 0,05$  (significativo); ns:  $p > 0,05$  (no significativo);  $\bar{X}$ : media; DS: desviación estándar; F: Fisher; p: significancia; PT: púrpura trombocitopénica; SMD: síndromes mielodisplásicos

En la última década, se han desarrollado técnicas de determinación indirecta de las plaquetas por métodos inmunológicos, que consisten en incubar la sangre extraída con EDTA, con un AcMo dirigido contra una proteína de la membrana plaquetaria, pudiendo ser analizado por citometría de flujo o por técnicas automáticas (sistema óptico bidimensional), métodos que sin duda ofrecen una mejor precisión y exactitud siendo el indicado para detectar fielmente una tasa inferior a  $20 \times 10^9/dl$  (Molero y cols., 2002). El recuento citofluorométrico

plaquetario ha demostrado sensibilidad, objetividad y fiabilidad, y ha sido ya recomendado como método de referencia por el Comité Internacional de estandarización en Hematología (ICSH) y por la Sociedad Internacional del Laboratorio de Hematología (ISLH) en el año 2001, utilizando dos AcMo dirigidos contra antígenos de la membrana plaquetaria: anti-CD61 y anti-CD41, y analizando el ratio plaquetas /glóbulos rojos. Se han utilizado también otros AcMo como el CD41a, CD42a y CD42b. Las ventajas de los métodos inmunológicos son su rapidez, exactitud y precisión, contando las plaquetas estables y activadas con un buen límite de detección y un excelente límite bajo de cuantificación. Las limitaciones se centran en el elevado costo de los equipos con esta tecnología, impidiendo que la mayoría de los laboratorios cuenten con ella (Thomas y cols., 2007)

En Cumaná actualmente, ningún laboratorio posee los equipos que disponen del método inmunológico. La mayoría de los equipos, tanto en los laboratorios privados como públicos cuentan con el principio de impedancia, por lo cual recurren al método manual como referencia (Brécher y Cronkite). Otros emplean un recuento indirecto basado en los leucocitos, que consiste en calcular el número de plaquetas en el frotis en 100 leucocitos (Molero y cols.,2002):

$$\text{Nº plaquetas}/\mu\text{l} = \frac{\text{número de plaquetas x total de leucocitos}}{100}$$

En las tablas 4 y 5, se resumen los resultados del análisis de correlación lineal realizado en los pacientes con PT y SMD respectivamente. En dichas tablas se puede apreciar una buena asociación entre los contajes de plaquetas obtenidos por las distintas metodologías, observándose entre ellos una diferencia estadística significativa ( $p < 0,05$ ) y una fuerte correlación positiva. Lo expuesto en las tablas antes mencionadas y expresado además en las figuras 1 (Apéndice 4) y 2 (Apéndice 5), ratifican la buena asociación entre los resultados



obtenidos, debido a que existe una correlación positiva para ambas patologías (PT y SMD) al realizar el recuento plaquetario por la técnica manual y automatizada, consiguiéndose un coeficiente de correlación muy cercano a 1. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el año 2000 por Kunicka y cols., en cuyo estudio el recuento plaquetario por el método manual y automatizado, mostró una fuerte correlación positiva ( $r = 0,975$ ).

Tabla 4. Análisis de correlación entre el conteo plaquetario manual y la técnica automatizada (impedancia, citometría de flujo y combinada), realizado en pacientes con púrpura trombocitopénica, provenientes de la consulta de hematología del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”

Principio del conteo plaquetario	N	$\bar{X} \pm DS$	r	P
Manual	20	109,75 $\pm$ 46,851	0,882	0,009*
Impedancia	20	108,75 $\pm$ 51,980		
Manual	20	109,75 $\pm$ 46,851	0,926	0,001*
Citometría de flujo	20	109,52 $\pm$ 48,810		
Manual	20	109,75 $\pm$ 46,851	0,915	0,025*
Combinado	20	106,30 $\pm$ 55,689		

n: número de pacientes;  $\bar{X}$ : media; DS: desviación estándar; r: coeficiente de correlación; \*:  $p < 0,05$  (significativo)

Tabla 5. Análisis de correlación entre el conteo plaquetario manual y la técnica automatizada (impedancia, citometría de flujo y combinada), realizado en pacientes con síndrome mielodisplásico provenientes de la consulta de hematología del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”

Principio del conteo plaquetario	N	$\bar{X} \pm DS$	r	P
Manual	12	95,83 $\pm$ 74,430	0,968	0,008*
Impedancia	12	93,17 $\pm$ 61,532		
Manual	12	95,83 $\pm$ 74,430	0,982	0,003*
Citometría de flujo	12	107,50 $\pm$ 78,762		
Manual	12	95,83 $\pm$ 74,430	0,867	0,045*
Combinado	12	105,33 $\pm$ 77,321		

n: número de pacientes;  $\bar{X}$ : media; DS: desviación estándar; r: coeficiente de correlación; \*:  $p < 0,05$  (significativo)

En cuanto al VPM, en este estudio no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) al determinar dicho parámetro en pacientes con PT, SMD y el grupo control, por medio de los analizadores automáticos con impedancia y citometría de flujo, tales resultados se presentan en la tabla 1 (Apéndice 3); la misma significancia ( $p > 0,05$ ) se obtuvo al comparar los valores obtenidos del VPM de todos los pacientes en estudio, por el contador hematológico automatizado con principio combinado, tal como se observa en la tabla 2 (Apéndice 3). La comparación estadística de estos resultados al no dar diferencias significativas, muestran que el VPM podría ser evaluado con un equipo automatizado bien calibrado, basado en cualquiera de los principios de determinación, aunque estos resultados podrían deberse al tamaño de la muestra. Se cree que el VPM está influenciado por determinados anticoagulantes, y por la presencia en sangre periférica de artefactos como fragmentos de eritrocitos y células inmaduras, que influyen en la distribución del volumen plaquetario y la aparente relación de éste con el conteo de plaquetas (Agustino y cols., 2002). Además, depende mucho de la técnica de medición, así como de la duración de condiciones y almacenamiento anteriores a la realización de las pruebas sanguíneas (Romero, 2009)

En una investigación realizada en 2002 por Molero y Jou, sostienen que los errores que se producen en los resultados de los laboratorios son debidos en un 82% a la fase preanalítica, el 6% a la fase analítica y el 12% a la postanalítica. Es por ello, que para brindar resultados en el análisis hematológico que sean precisos, relevantes para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes, así como útiles para estudios epidemiológicos o de vigilancia de la salud pública, el laboratorio debe ser fiable, eficaz y eficiente sin menoscabo de la calidad, sea cual sea la metodología que se esté empleando. Para lograr estos objetivos, se requiere aplicar todas las normas de control de calidad, y realizar actividades específicas para la evaluación de la misma, tanto interna como externamente.

En base a los resultados obtenidos, podría considerarse como aceptables el recuento obtenido tanto por la metodología manual como por la automatizada ya sea por el principio de impedancia, citometría de flujo o combinado (Impedancia volumétrica, radiofrecuencia y dispersión de la luz láser), aun cuando se trata de pacientes con un número de plaquetas por debajo del rango de referencia. Debido a que las sustancias que interfieren, siguen siendo uno de los principales inconvenientes para determinar ciertos analitos en el examen hematológico automatizado, se recomienda emplear el método manual de Brécher y Cronkite conjuntamente con la revisión de frotis sanguíneo, de tal manera que los resultados sean confiables y coincidan con la clínica del paciente. Es importante destacar que los laboratorios automatizados, deben establecer sus criterios propios para el empleo de un método alternativo como el manual y la revisión dirigida de los extendidos de sangre, basada en los objetivos de rendimiento establecidos, las señalizaciones del instrumento y las limitaciones inherentes a él.

Es por ello, que los profesionales de laboratorio tendrán que mantener una base de conocimientos sobre los principios básicos de la instrumentación y las sustancias o condiciones que interfieren en las pruebas de laboratorio clínico, tales como en el conteo de plaquetas. Resultados inusuales constituyen una señal de alerta que requiere la confirmación de los análisis por los métodos auxiliares y alienta a los profesionales de laboratorio al estudio constante de los avances en hematimetría para hacer más segura y más rápida la asistencia clínica de los pacientes. De esta manera, se logrará optimizar el diagnóstico, contribuir al pronóstico y participar en el buen seguimiento terapéutico de los pacientes

## CONCLUSIONES

Los valores del conteo plaquetario de los pacientes con SMD y PT obtenidos por los analizadores automáticos con distintos principios fueron similares, demostrando que el análisis por cualquiera de dichos equipos puede ser válido para los conteos bajos de plaquetas.

El recuento de plaquetas por el método manual en pacientes con PT y SMD, arrojó una correlación positiva y una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ), al compararlo con la metodología automatizada, pudiéndose aceptar los valores por este método.

La revisión de los frotis sanguíneos permitió corroborar el tamaño, morfología y distribución de las plaquetas en todos los pacientes, considerándose como una herramienta útil para la confirmación de éstas y otras patologías.

El valor del VPM para los grupos en estudio, no obtuvo diferencias al ser determinado por los tres analizadores automáticos con distinto principio (impedancia, citometría de flujo y combinado)

## **RECOMENDACIONES**

Participar en programas de garantía de calidad que lleven a mejorar la gran variabilidad en los reportes y garantizar la confiabilidad del proceso analítico, con el fin de obtener el máximo beneficio de las metodologías de avance vigentes.

Promover campañas de actualización para dar a conocer las nuevas tecnologías y los distintos parámetros que ofrecen para mejorar la calidad del análisis hematológico y así ayudar y orientar al clínico para un óptimo diagnóstico y tratamiento de los pacientes.

Para futuros estudios, podrían incluirse un mayor número de pacientes con PT, SMD y/o trombocitosis, y así comparar el rendimiento de las técnicas manual y automatizada cuando el número de plaquetas están fuera del rango de referencia.

## BIBLIOGRAFÍA

Abbott diagnostics. 2004. Manual de operaciones del sistema Celldyn 3200. Abbott laboratories. Illinois, USA

Agustino, A.; Piqueras, R.; Pérez, M.; García, P. y Navarro, J. 2002. Recuento de plaquetas y volumen plaquetario medio en una población sana. Revista diagnóstica de biología, 51: 5-15

Arenas, T. 2000. Recuento de plaquetas: comparación de dos metodologías. Trabajo de pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.

Briggs, C.; Harrison, P. y Grant, D. 2000. New quantitative parameters on a recently introduced automated blood cell counter: the XE 2100. Haematology, 22: 345-350.

Caunedo, P. 2004. La citometría de flujo en el estudio de las plaquetas. Revista cubana de hematología, inmunología y hemoterapia, 20: 5-7.

Comité Internacional de estandarización en Hematología (ICSH)/Sociedad Internacional del Laboratorio de Hematología (ISLH). 2001. Platelet counting by the rbc/platelet ratio method; a reference method. American journal of clinical pathology, 115:460-464

Coulter LH 500 hematology analyzer. 2007. User Manual. Beckman Coulter, Inc. Brea, USA.

Crawford, N. y Scrutton, M. 1987. Biochemistry of blood platelet. Bloom, A. L y Thomas, D.P (eds). Haemostasis and thrombosis, 15: 47-77.

Douglas, B.; Cines, M. y Blanchette, V. 2002. Immune thrombocytopenic purpura. The new England journal of medicine, 346: 995-1008.

Fernández, N. y Hernández, P. 1999. Síndrome mielodisplásico.I. Biología y clínica. Revista cubana de hematología, inmunología y hemoterapia, 16(1): 5-20.

Flores, A. y Orna, E. 2010. Tratamiento de la púrpura trombocitopénica inmune en el adulto. Revista de hematología, 11(2): 95-100

Fragachán, L. 1984. Manual de hemostasia y coagulación sanguínea. Ediciones de la Biblioteca UCV. Caracas.134-147.

Fundora, T. 1999. Supervivencia de las plaquetas en síndromes mielodisplásicos. Revista cubana de hematología, inmunología y hemoterapia, 15(2): 148- 159.

Gallardo, A. y López, A. 2007. Programa de Evaluación Externa de la Calidad en Morfología Hemática. Diseño y experiencia en laboratorios clínicos Venezolanos. VITAE Academia Biomédica Digital, 32: 1-3.

García, L. 2008. Nuevos parámetros plaquetarios y análisis de la médula ósea. Haematologica, 93: 5-9.

Kaplan, S.; Johnson, K. y Wolfe, N. 2001. Validation of low platelet counts from coulter lh 750 and coulter gen s analyzers. Laboratory haematology, 7:198–203

Knoll, J. 2000. Clinical automated haematology systems. Schalm's veterinary haematology, 5: 3–11.

Kunicka, J.; Fischer, G.; Murphy, J. y Zelmanovic, D. 2000. Improved platelet counting using two-dimensional laser light scatter. American society for clinical pathology, 114: 283-289.

Latif, S.; Veillon, D.; Brown, D.; Kaltenbach, J.; Linscott, A.; Oberle, A. y Cotelingam, J. 2003. Spurious automated platelet count enumeration of yeast forms as platelets by the cell-dyn 4000. Haematopathology, 120: 882-885

Leite, L.; Silva, M. y Miranda, M. 2007. Comparação entre a contagem de plaquetas pelos métodos manual e automatizado. NewsLab, 81: 106-114.

Lewis, S.; Bain, B. y Bates, L. 2008. Dacie y Lewis, hematología práctica. Decima edición. Editorial Elsevier. Madrid.

Maya, G. 2007. Evaluación del paciente con trombocitopenia. Medicina y laboratorio, 13: 411-435.

McKenzie, S. 2000. Hematología clínica. Segunda edición. Editorial manual moderno. Madrid.

Molero, T. y Jou, J. 2002. Nuevas aplicaciones clínicas de la automatización del laboratorio de hematología. Haematologica, 87: 1-2

Molero, T.; Labarta, A.; Lemes, C.; De la iglesia, S. y Santana, A. 2002. Nuevos índices plaquetarios: valor en el diagnóstico y trascendencia en las decisiones terapéuticas. Haematologica, 87: 3-6

Molero, T.; Lemes C. y De la iglesia, S. 2010. Utilización de anticuerpos monoclonales en los equipos de hematimetría con sistemas óptico y fluorescencia. Haematologica, 95: 20-25

Navarrete, J. 2005. Citometría de flujo en la evaluación del potencial de membrana y viabilidad celular de Helicobacter pylori. Trabajo de postgrado. Escuela de graduados, Universidad de Concepción, Chile.

Olsen, L.; Kristensen, A. y Haeggström, J. 2004. Increased platelet aggregation response in Cavalier King Charles Spaniels with mitral valve prolapse. Journal of veterinary diagnosis investigation, 15: 209–216.

Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2001. Bioética. Principios éticos para los Investigadores en seres humanos. Publicación científica. OMS-OPS.

Pérez, J.(ed).1995. Hematología. Tomo II. Editorial Disinlimed. Caracas, Venezuela.

Rasi, V. y Lintula, R.1986. Platelet function in the myelodysplastic syndromes. Journal of haematology, 36: 71-73.

Rodak, B. 2004. Hematología. Fundamentos y aplicaciones clínicas. Segunda edición. Editorial médica panamericana. Buenos Aires, Argentina.

Romero, H. 2009. Citometría hemática automatizada. Revista electrónica de portales médicos, 4: 1-4.

Ruiz, A.; Artilles, D.; Ruiz, L.; Cortés, V.; Arce, V.; Alonso, U.; Aparicio, J. y Ruiz, M. 2006. Síndrome mielodisplásico primario. Análisis de características morfológicas y evolución. VII congreso virtual hispanoamericano de anatomía patológica, 6: 1-10

Salazar, L.; Navarrete, M.; Jiménez, R.; Carrillo, J.; Mora, L.; Barrante, M.; Valverde, B. y Barrante, M. 1999. Evaluación de parámetros plaquetarios en trombocitosis pediátrica. Revista costarricense de ciencias médicas, 20: 3-4.

Sandhaus, L.; Osei, E.; Agrawal, N.; Dillman, C. y Meyerson, H. 2002. Platelet counting by the Coulter LH 750, Sysmex XE 2100, and Advia 120. A comparative analysis using the RBC/platelet ratio reference method. American society for clinical pathology, 118: 235-241.

Shattil, S.; Cunninham, M. y Hoxie, J. 1987. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. Blood, 70: 307-315.



Sokal, R. y Rohlf, J. 1981. Biometría, principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. Editorial H. Blume. Madrid, España.

Thomas, A.; Mattern, D.; Köhler, G. y Finke, J. 2007. Reticulated platelet counts correlate with treatment response in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura and help identify the complex causes of thrombocytopenia in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Cytometry, 72: 241–248

Vives, J. y Aguilar, J. 2006. Manual de técnicas de laboratorio en hematología. Tercera edición. Editorial Masson S.A, Barcelona.

## **APÉNDICES**

### **Apéndice N° 1**

UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NÚCLEO DE SUCRE  
ESCUELA DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

Yo \_\_\_\_\_ portador de la C.I. \_\_\_\_\_, a través de la presente, manifiesto que he sido informado y doy mi consentimiento, para participar en la toma de muestra del trabajo intitulado “COMPARACIÓN DEL CONTAJE PLAQUETARIO, EMPLEANDO DIFERENTES METODOLOGÍAS, EN PACIENTES CON PÚRPURA TROMBOCITOPÉNICA Y SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS”, el cual le servirá como Trabajo de Grado en la modalidad investigación, a la Br. Norielis del Carmen Zabala García, C.I. 17870 220, estudiante regular de la Licenciatura en Bioanálisis.

---

Firma del paciente

### **Apéndice N° 2**

UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NÚCLEO SUCRE  
ESCUELA DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

Proyecto de trabajo de grado intitulado: Comparación del contaje plaquetario, empleando diferentes metodologías, en pacientes con púrpura trombocitopénica y síndromes mielodisplásicos. Tesista: Norielis Zabala. CI: 17 870 220.

### **Encuesta para datos epidemiológicos y clínicos**

Nombre: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_

Dirección actual: \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_

Diagnóstico: \_\_\_\_\_

Fecha del diagnóstico: \_\_\_\_\_

¿Tiene algún tratamiento? SI \_\_\_\_ NO \_\_\_\_

De ser afirmativa su respuesta, indique cuál es el tratamiento

\_\_\_\_\_

Signos y síntomas: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### **Apéndice Nº 3**

Tabla 1. Comparación del volumen plaquetario medio determinado por el analizador Swelab ALFA (principio: impedancia) y Cell-dyn 3200 (principio: citometría de flujo) en pacientes pertenecientes a los tres grupos en estudio (púrpura trombocitopénica, síndromes mielodisplásicos y control) provenientes de la consulta de hematología del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”

Grupos	Principio del analizador automático	Intervalo	$\bar{X}$	DS	F	P
PT	Impedancia	7,20-12,20	8,82	1,34	1,787	0,271ns
	Citometría de flujo	7,36-16,50	11,03	2,23		
SMD	Impedancia	6,80-10,30	8,25	1,16	4,640	0,36ns
	Citometría de flujo	7,42-14,70	10,57	2,89		
Control	Impedancia	6,50 - 8,40	7,47	0,47	2,470	0,095ns
	Citometría de flujo	6,44-10,70	8,18	1,15		

$\bar{X}$ : media; DS: desviación estándar; F: Fisher; ns: p>0,05 (no significativo) p: significancia; PT: púrpura trombocitopénica; SMD: síndromes mielodisplásicos

Tabla 2. Comparación del volumen plaquetario medio determinado por el analizador Swelab ALFA (principio: impedancia) y Coulter LH 500 (principio combinado: Impedancia volumétrica, radiofrecuencia y dispersión de la luz láser) en pacientes pertenecientes a los tres grupos en estudio (púrpura trombocitopénica, síndromes mielodisplásicos y control) provenientes de la consulta de hematología del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”

Grupos	Principio del analizador automático	Intervalo	$\bar{X}$	DS	F	P
PT	Impedancia	7,20-12,20	8,82	1,34	1,658	0,301 ns
	Combinado	7,40-12,80	9,46	1,32		
SMD	Impedancia	6,80-10,30	8,25	1,16	0,798	0,711 ns
	Combinado	6,90-10,60	8,46	1,27		
Control	Impedancia	6,50 - 8,40	7,47	0,47	1,576	0,253 ns
	Combinado	6,80 - 9,40	8,09	0,72		

$\bar{X}$ : media; DS: desviación estándar; F: Fisher; ns: p>0,05 (no significativo) p: significancia; PT: púrpura trombocitopénica; SMD: síndromes mielodisplásicos

### Apéndice N° 4

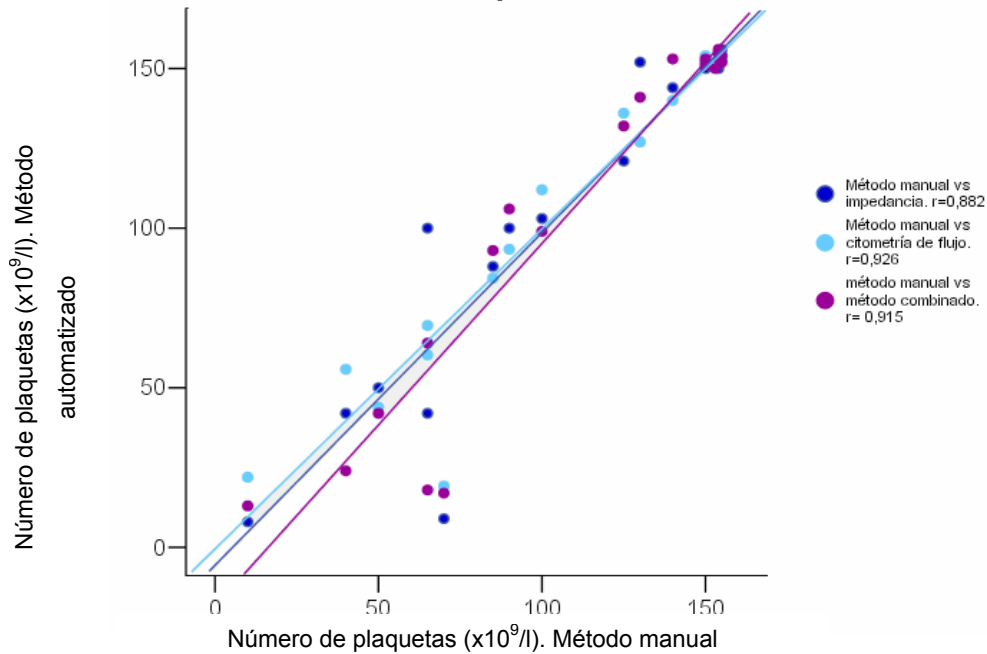


Figura 1. Correlación del recuento de plaquetas entre el método manual y automatizado (impedancia, citometría de flujo y combinado), en pacientes con púrpura trombocitopénica provenientes de la consulta de hematología del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”

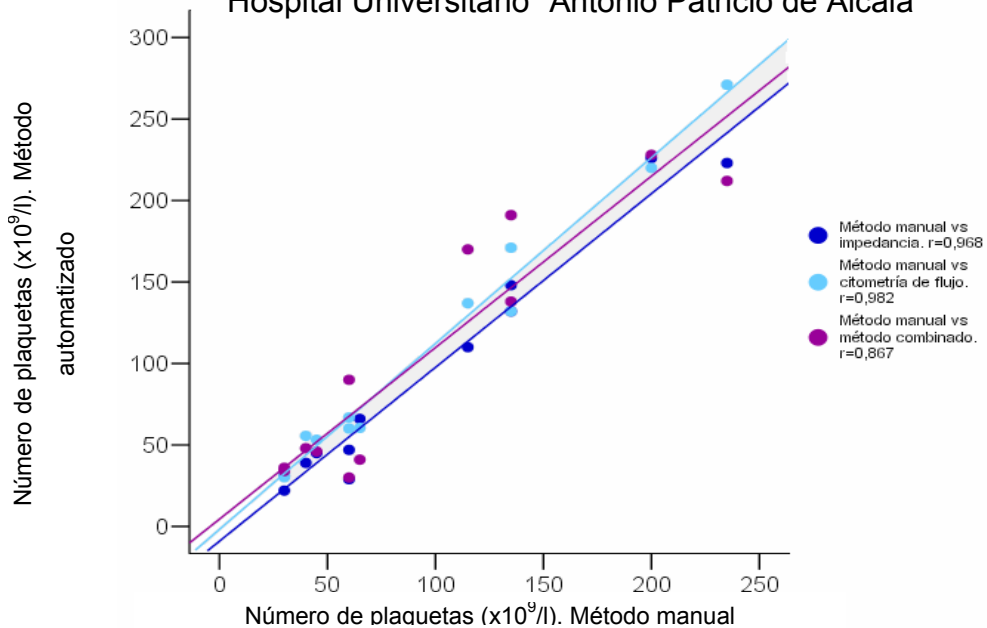


Figura 2. Correlación del recuento de plaquetas entre el método manual y automatizado (impedancia, citometría de flujo y combinado), en pacientes con síndromes mielodisplásicos provenientes de la consulta de hematología del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”

## ANEXOS



Anexo 1. Swelab ALFA



Anexo 2. Cell-dyn 3200



Anexo 3. Beckman Coulter LH 500

## HOJAS DE METADATOS

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

<b>Título</b>	COMPARACIÓN DEL CONTAJE PLAQUETARIO, EMPLEANDO DIFERENTES METODOLOGÍAS, EN PACIENTES CON PÚRPURA TROMBOCITOPÉNICA Y SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS
<b>Subtítulo</b>	

### Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
<b>Zabala García, Norielis del Carmen</b>	<b>CVLAC</b>	<b>17870220</b>
	<b>e-mail</b>	<b>norizag_25@hotmail.com</b>
	<b>e-mail</b>	
	<b>CVLAC</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>e-mail</b>	

### Palabras o frases claves:

<b>Contaje plaquetario</b>
<b>Púrpura trombocitopénica</b>
<b>Síndromes mielodisplásicos</b>



## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

### Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

### Resumen (abstract):

Se valoró el conteo plaquetario de tres grupos de pacientes, de acuerdo al método manual de Brecher y Cronkite y automatizado, usando analizadores hematológicos con diferentes principios: Swelab ALFA (impedancia), Cell-dyn 3200 (citometría de flujo) y Beckman Coulter LH 500 (impedancia volumétrica, radiofrecuencia y dispersión de la luz láser); en individuos con púrpura trombocitopénica (PT) y síndromes mielodisplásicos (SMD), provenientes de la consulta de hematología del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” de la ciudad de Cumaná. Para tal fin, se tomaron muestras de sangre a pacientes de ambos sexos, con edades comprendidas entre 15 y 50 años, ya diagnosticados con dichas enfermedades. Asimismo, se tomaron 20 individuos procedentes de la consulta antes mencionada, sin alteración del número de plaquetas como grupo control. Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y correlación a un 95% de confiabilidad, arrojando diferencia significativa en los pacientes con PT y SMD tanto por el método manual como por los distintos automatizados ( $p < 0,05$ ) y una correlación positiva; en cambio, en el grupo control no se obtuvieron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Tomando en cuenta los resultados obtenidos, se pueden considerar como válidos los recuentos realizados por los diversos métodos, tanto para pacientes con un conteo de plaquetas dentro del rango de referencia, como por debajo del mismo.

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

**Contribuidores:**

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail				
<b>Hannaoui, Erika</b>	ROL	CA <input type="checkbox"/>	AS <input type="checkbox"/>	TU <input checked="" type="checkbox"/>	JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	13836078			
	e-mail	erikajhr@yahoo.com			
	e-mail				
<b>Campos, Miguel</b>	ROL	CA <input type="checkbox"/>	AS <input type="checkbox"/>	TU <input type="checkbox"/>	JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	5861122			
	e-mail	miguecampos86@hotmail.com			
	e-mail				
<b>Ponce, Yusulbeht</b>	ROL	CA <input type="checkbox"/>	AS <input type="checkbox"/>	TU <input type="checkbox"/>	JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	11829822			
	e-mail	yusulbehtc@yahoo.es			
	e-mail				
		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Fecha de discusión y aprobación:**

**Año      Mes      Día**

2012	05	29
------	----	----

**Lenguaje: SPA**

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

**Archivo(s):**

<b>Nombre de archivo</b>	<b>Tipo MIME</b>
<b>TESIS-ZABALA.DOC</b>	<b>Application/word</b>

**Alcance:**

**Espacial:** NACIONAL (Opcional)

**Temporal:** TEMPORAL (Opcional)

**Título o Grado asociado con el trabajo:** Licenciada en Bioanálisis

**Nivel Asociado con el Trabajo:** LICENCIADA

**Área de Estudio:** Bioanálisis

**Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:**

UNIVERSIDAD DE ORIENTE

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
CONSEJO UNIVERSITARIO  
RECTORADO

CUN°0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano  
**Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ**  
Vicerrector Académico  
Universidad de Oriente  
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
SISTEMA DE BIBLIOTECA  
RECIBIDO POR *Mazley*  
FECHA *5/8/09* HORA *5:30*

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

*JUAN A. BOLANOS CUNVELO*  
Secretario

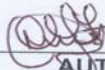


C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

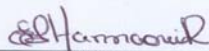
JABC/YGC/manuja

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso- 6/6

**Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009) :** "los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización".



AUTOR 1



TUTOR