

00544

4
28



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**EVALUACION DE SANGRES ESTABILIZADAS,
PREPARADAS EN LABORATORIO,
PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LOS
AUTOANALIZADORES DE CITOLOGIAS
HEMATICAS.**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN BIOQUIMICA CLINICA
(HEMATOLOGIA)
P R E S E N T A :
ALEJANDRO MORALES DE LA VEGA**



MEXICO, D.F.

1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

00544



UNITED STATES DEPARTMENT OF JUSTICE
OFFICE OF THE ATTORNEY GENERAL

4
28j

UNITED STATES DEPARTMENT OF JUSTICE

INVESTIGATION OF THE ACTS OF
TERRORISM AND THE
ACTS OF VIOLENCE
COMMITTED BY
INDIVIDUALS OR GROUPS
WHICH ARE KNOWN OR
REASONABLY BELIEVED TO
BE ENGAGED IN SUCH ACTS
AND TO BE A THREAT TO
THE NATIONAL DEFENSE
OR THE NATIONAL SECURITY
OR THE PUBLIC SAFETY
OR THE INTERESTS OF
THE UNITED STATES

UNITED STATES DEPARTMENT OF JUSTICE

1975

DIRECTOR DE TESIS

Q.F.B. JOSEFA PIEDRAS ROSS

Deseo manifestar mi reconocimiento y gratitud al personal del Departamento de Oncohematología del Instituto Nacional de la Nutrición "Dr. Salvador Zubirán" de la SSA, por su desinteresada colaboración.

A todos los SERES que me apoyaron y sirvieron de inspiración, haré todo lo posible por manifestarles mi agradecimiento personalmente.

INDICE.

I.- INTRODUCCION.

- I.1. GARANTIA DE CALIDAD.
- I.2. CALIBRACION DE EQUIPOS.
- I.3. SEGUIMIENTO DE LOS EQUIPOS.

II.- OBJETIVOS.

III.- MATERIAL Y METODOS.

IV.- RESULTADOS.

V.- DISCUSION.

VI.- CONCLUSIONES.

VII.- BIBLIOGRAFIA.

I.- INTRODUCCION.

Para que un laboratorio de diagnóstico cumpla con los objetivos para los que ha sido creado, los resultados de las pruebas que realice deben ser confiables. La confiabilidad se basa en la precisión y exactitud, sin diferencia en los resultados cuando una prueba se realiza por metodología o instrumentos distintos. Esto es esencial cuando el manejo y tratamiento de un paciente se basa en los resultados de las pruebas de laboratorio (1).

El laboratorio de hematología no escapa a estos lineamientos; el que de él se obtengan resultados confiables es muy necesario no sólo para conocer el estado de un paciente, sino para el escrutinio de la población en exámenes sanitarios así como para establecer valores de referencia.

Es indispensable garantizar la calidad en la práctica del laboratorio de hematología para obtener la confiabilidad, y el que este objetivo se cumpla es responsabilidad del Químico o profesionalista que esté a cargo del laboratorio quien debe asegurarse que las pruebas que se realicen satisfagan las necesidades del hospital, clínica o comunidad a la que preste servicios y que los resultados que se obtengan sean confiables, reproducibles y tan exactos como sea posible de acuerdo con la O. M. S. para los laboratorios de hematología (1).

En los laboratorios pequeños aún es común encontrar hemocitómetro de Neubauer como único recurso para el recuento celular así como las pipetas introducidas por Herman Sahli (1856 - 1933) en 1902 para la

determinación de la concentración de hemoglobina siendo junto con el microscopio, los instrumentos principales para el procesamiento de las biometrías hemáticas. Sin embargo, hoy en día, los laboratorios de hematología de los grandes hospitales están urgidos para producir datos más rápidamente y a más bajo costo que en épocas anteriores. Esto ha conducido a que los fabricantes de equipos automatizados para laboratorio respondan a esta demanda con la proliferación de aparatos cuyo desarrollo técnico permite no sólo tener un mayor control sobre las pruebas sino que, además, se ha ampliado el número de mediciones (2, 3).

Los equipos que se utilizan para procesar las biometrías se conocen como analizadores automatizados de canales múltiples y desde que fueron introducidos al medio hospitalario hace poco más de veinte años su presencia ha ido aumentando gradualmente en los laboratorios de hematología clínica de todo el mundo. El 80% de los resultados obtenidos los producen estos equipos, permitiendo determinar cuentas completas de células sanguíneas de un gran número de especímenes de rutina con una alta eficiencia y a menor costo (2, 3).

Las variables que originalmente incluyeron estos equipos son: las cuentas de eritrocitos y leucocitos, la concentración de hemoglobina, el valor del hematocrito y el cálculo de los índices eritrocíticos pero, con el mejoramiento de la tecnología, en los últimos años se han sumado a las anteriores determinaciones el recuento plaquetario, las gráficas de tamaño celular como

distribución de frecuencia y la diferenciación entre subpoblaciones de leucocitos obteniéndose biometrías hemáticas muy completas.

Sin embargo, aunque los programas de control de calidad externo del Colegio de Patólogos Americanos muestran una mejoría substancial en la calidad de los resultados, mantener estos instrumentos libres de sesgos durante el trabajo rutinario sigue siendo un problema.

Otro de los grandes problemas de estos instrumentos es su alto costo, pues aún los más pequeños cuestan varios miles de nuevos pesos.

Son varias las casas comerciales que se dedican a la manufactura de estos equipos, pero todas ellas manejan como fundamento dos principios para el conteo celular: la impedancia eléctrica y óptico.

Si se fuerzan a las células sanguíneas a fluir a través de un orificio pequeño entre dos electrodos o en un flujo estrecho entre una fuente de luz y un detector, en cualquiera de los casos, la corriente eléctrica o la luz detectada puede cambiar siempre que una célula pase por el punto de detección. Si las partículas son esféricas, la magnitud del cambio de señal es proporcional al volumen celular y así las células se pueden clasificar por tamaño al mismo tiempo que son contadas, todo esto después de comparar las señales celulares con señales de partículas de volumen conocido.

La muestra de sangre se divide generalmente en dos partes las que fluyen a través de canales para eritrocitos y leucocitos respectivamente. La muestra para eritrocitos se mezcla en un diluyente no hemolizante, en este caso se ignoran a los leucocitos debido a su bajo número y la contribución de las plaquetas se elimina por el uso de un umbral inferior que permite que los eritrocitos sean contados y medidos. En el canal de leucocitos, se añade un reactivo lítico para destruir a los eritrocitos, las señales causadas por las plaquetas y los restos celulares se eliminan con el uso de un umbral inferior. Las plaquetas se pueden contar en el canal de eritrocitos ajustando los umbrales tanto inferior como superior en el detector de señales.

La media del volumen de un gran número de eritrocitos corresponde al volumen globular medio (VGM), el producto del VGM por la cuenta total de eritrocitos nos dará el valor del hematocrito. De la medición de la densidad óptica de la sangre hemolizada en el canal de leucocitos se obtiene la concentración de la hemoglobina y con estos datos se puede calcular la concentración media de hemoglobina corpuscular (CMHC) y la hemoglobina corpuscular media (HCM).

Los modelos más recientes de analizadores de canales múltiples se diferencian de los pequeños contadores en que estos últimos requieren la adición, mezclado de sangre y reactivos de manera manual, en cambio, los grandes equipos modernos cuentan con aditamentos que mezclan los especímenes de manera automática, los identifican por medio de códigos de barras, toman las muestras de los tubos tapados, realizan todos los cálculos

necesarios y transmiten todos los datos obtenidos a una computadora anexa la cual se puede conectar a una computadora receptora de todos los resultados que se obtienen del laboratorio. Además, la mayoría de estos grandes equipos automáticos puede hacer gráficas de los histogramas de distribución de eritrocitos, leucocitos y plaquetas, puede realizar el cálculo del coeficiente de variación del tamaño eritrocitario mejor conocido como amplitud de distribución de eritrocitos (ADE); algunos calculan la media de un gran número de plaquetas o volumen plaquetario medio (VPM). Otra característica que poseen los equipos más completos, es que dan "banderas" o señales de alarma cuando se obtienen resultados anormales en la distribución de las células invitando así a analizar los histogramas además de observar los frotis de las muestras en cuestión pues cabe la posibilidad de que eritrocitos muy pequeños sean contados como plaquetas o que plaquetas gigantes se detecten como eritrocitos (2).

I.1. GARANTIA DE CALIDAD.

La garantía de la calidad en el laboratorio de hematología evita al máximo el sesgo, que es lo contrario de exactitud y que se define como la diferencia entre el valor medido y el valor verdadero. Los analizadores de canales múltiples no realizan mediciones directas, ya que comparan una cuenta con otra. Para obtener valores apropiados de las muestras sanguíneas, estos instrumentos se ajustan por medio de calibradores con valores asignados. Esto quiere decir que el control de los sesgos en estos equipos depende de lo verdadero que sean los valores que se le asignen a los calibradores, de la eficiencia de la

transferencia de los valores del calibrador al instrumento y de la prevención de tendencias del instrumento después de la calibración.

Los métodos convencionales para el control de calidad analítico utilizan estándares para la calibración de máquinas y de muestras control para detectar sesgos; sin embargo, esto no es posible para los analizadores de canales múltiples ya que, aunque existen métodos de referencia aceptados para la medición de hemoglobina y hematocrito, no existen estándares o métodos de referencia para la enumeración de células. En 1987, Crawford, Lau y Bull señalaron que el principal problema para el control de calidad de los analizadores cuyo principio de recuento celular sea la impedancia eléctrica, consiste en las diferencias significativas entre los datos del hematocrito o de VGM obtenidos por el instrumento y los resultantes del método de microhematocrito por centrifugación.

Como no existe un sistema de control de calidad ideal para los analizadores de canales múltiples, se deben utilizar estrategias de control interno tales como: sistemas de control y calibración que usen sangre fresca, preparaciones de sangre estabilizada, materiales no biológicos o funciones estadísticas a partir de los datos de los pacientes.

1.2. CALIBRACION DE EQUIPOS.

En la búsqueda desesperada del calibrador ideal, se ha visto que la sangre fresca anticoagulada con EDTA reúne muchas de las características críticas para cumplir con esta función ya que es física y químicamente idéntica a

los especímenes de los pacientes y se evitan los errores asociados con la sustitución o fijación de la sangre fresca, sin embargo, tiene la desventaja del alto costo que adquiere al asignársele valores de suficiente credibilidad que garantice su uso como calibrador. Hay que añadir, que la sangre fresca es inestable y no se puede utilizar después de 4 horas de almacenamiento a temperatura ambiente ó 24 horas a 4°C.

El uso de sangre humana estabilizada como calibrador es la opción más utilizada por las casas comerciales. Su vida media es larga comparada con la sangre fresca y su utilidad en los laboratorios clínicos es de varias semanas. Sin embargo, a pesar de ser ampliamente utilizados tienen sus inconvenientes, pues además de tener una estabilidad limitada, son muy costosos y los esfuerzos por estabilizar la sangre humana inevitablemente comprometen su función como calibrador.

Las células estabilizadas son significativamente diferentes de la contraparte sangre fresca tanto en sus características físicas como funcionales por lo que pueden comportarse de manera diferente en los compartimientos del instrumento además, según sea la casa comercial, los instrumentos operarán con diferentes principios por lo que cada uno de ellos responderá en diferente grado a las células estabilizadas así que los valores asignados no son necesariamente intercambiables entre los instrumentos. Se consideran los valores asignados como únicos para el instrumento para el que el calibrador es destinado.

Otra opción es la utilización de materiales no biológicos tales como partículas de látex que ofrecen varias ventajas debido a su larga estabilidad y

uniformidad sólo que, su uso como material de calibración se ve limitado a algunas funciones tales como la calibración del tamaño del pulso en donde sólo controla un aspecto de la cuenta de células (3).

Se han utilizado funciones estadísticas basándose en los datos obtenidos de las mediciones de los pacientes para evaluar la calibración de los equipos una vez que el instrumento se ha calibrado por otro método (3).

1.3. SEGUIMIENTO DE LOS EQUIPOS.

Una vez que el equipo está satisfactoriamente calibrado, es necesaria una evaluación del instrumento durante su uso para tener la certeza de que en los valores obtenidos de las muestras no haya desviaciones o tendencias debido a un mal funcionamiento del instrumento. Seleccionar el material de control y el procedimiento de seguimiento no es sencillo.

El material de control debe ser lo más semejante posible a la sangre completa fresca para que sirva como sensor de funcionamiento defectuoso del equipo, sin embargo, existe el problema de que, entre más parecido sea el material de control a la sangre fresca es menos estable, por lo que no será muy adecuado para propósitos de control de calidad longitudinal (3, 5).

Se han hecho varios intentos para superar estos problemas de estabilidad empleándose diversos materiales como sustitutos de las células

sanguíneas tales como: partículas de látex, pólenes, células de ave fijadas, levaduras y otros materiales de origen inespecífico (6, 12 - 14), sin embargo, todos ellos presentan problemas de diversa índole, entre ellos, el sufrir agregaciones, no tener el tamaño adecuado pero principalmente, el comportarse de manera diferente a las células sanguíneas.

En los países desarrollados se producen materiales de control y calibración comercialmente a base de células sanguíneas estabilizadas cuya eficiencia está plenamente demostrada. Para ello se aprovecha el efecto que tienen los agentes fijadores sobre ellas, los más utilizados son formaldehído y glutaraldehído; el primero tiene las propiedades de gelificar las proteínas solubles de la matriz citoplásmica así como de endurecer las membranas celulares debido a su efecto desnaturalizante; el segundo actúa como un agente homobifuncional debido a sus dos grupos aldehído los cuales enlazan covalentemente a los grupos amino de proteínas vecinas de las membranas celulares confiriéndoles rigidez (15 - 20).

Existe un método de control de calidad que utiliza funciones estadísticas de medición tomadas de los datos obtenidos de las muestras de los pacientes, su utilidad ha sido probada y es ahora ampliamente aceptado para el seguimiento longitudinal de los analizadores automatizados de canales múltiples. Bull diseñó, en 1974, un modelo matemático que permite determinar un conjunto de medias compensadas a partir de grupos de muestras (X_B) que en cada caso se calculan a partir de la media de cada grupo anterior (X_A). Este procedimiento se basa en el hecho de que el valor medio de los índices eritrocíticos (VGM,

HCM y CMHC), obtenidos sistemáticamente por los autoanalizadores, varía poco para una población determinada en el curso del tiempo y además presenta una distribución normal o gaussiana. La media de Bull se calcula a partir de grupos constituidos por un mínimo de 20 muestras con objeto de facilitar el control permanente del autoanalizador evitando que, en caso de error, el número de muestras que haya que repetir sea excesivo.

La fórmula simplificada del algoritmo de Bull, es la siguiente:

ALGORITMO DE BULL

$$X_B = X_A \pm \left(\sum \frac{D |d_i|}{|d_i| N} \right)^2$$

en donde:

el signo + o - lo da: $\sum \frac{D}{|d_i|}$

X_B = nueva media

X_A = media anterior

D = diferencia de cada valor
con la media anterior

|D| = valor absoluto de D

|d| = raíz cuadrada de |D|

N = número de valores

Σ = sumatoria algebraica

Debido a que en el cálculo se consideran los valores del grupo que se analiza y todos los del grupo anterior o los de toda la población, detecta de forma muy precisa la posible presencia de valores dispares o aberrantes debido a un defecto en el funcionamiento o en la calibración del autoanalizador. Afortunadamente, los equipos modernos ya tienen integrado un programa de cálculo automático del

algoritmo de Bull así como su representación en gráficas de Levey - Jennings los que facilita el seguimiento del aparato (7 - 11). Una desventaja de este método es que sólo puede aplicarse en aquellos sitios que realicen por lo menos 100 biometrías diarias (3).

De lo señalado anteriormente, se observa que aún en los países desarrollados existen serios problemas para garantizar la calidad en los laboratorios de hematología, de ahí que tanto la O. M. S., el Colegio de Patólogos Americanos así como el Comité Internacional para la Estandarización en Hematología han establecido normas que se deben cumplir para el adecuado manejo de los laboratorios de hematología. Estas, no sólo abarcan el control interno de un laboratorio sino que parten desde establecer los principios y métodos para garantizar la calidad en hematología, queriendo decir con ello que van desde describir los métodos de referencia para asignar valores a los calibradores así como a materiales de control y que deben ser estrictamente seguidos por las casas comerciales dedicadas a la producción de éstos o por los laboratorios clínicos que lo hagan. También pasan por los principios de control interno de calidad que incluyen los recursos estadísticos, las pruebas que deben aplicarse a los materiales de control, gráficas, etc. y que pueden adaptarse a los diferentes tamaños de laboratorio. Además incluyen programas de evaluación externa de la calidad, análisis estadísticos y características que deben poseer los materiales de control utilizados.

En nuestro país las cosas son diferentes, pues no existen programas de evaluación externa que sean apoyados por la Secretaría de Salud

y que tengan reconocimiento internacional, así que los laboratorio por cuenta propia deben establecer sus programas de control interno pues los programas internacionales tienen un alto costo.

En un buen programa interno de control de calidad se debe realizar en cada lote, una medición en una muestra denominada "muestra control", con el fin de alertar ante la presencia de un posible error sistemático al medir repetitivamente el control.

No existe la producción nacional de este tipo de materiales. Si un laboratorio requiere evaluar su analizador de canales múltiples depende por completo de los controles que algunos representantes comerciales importan del extranjero. Esto representa un problema pues se está expuesto a complicaciones aduanales y de transporte que puede provocar que sufra un almacenamiento inadecuado, pudiendo repercutir en su calidad añadiéndose a lo anterior, el alto costo que tienen este tipo de materiales por lo que cualquier esfuerzo por desarrollar la producción local de controles celulares está plenamente justificada (12 -14).

El Departamento de Oncohematología del Instituto Nacional de la Nutrición "Dr. Salvador Zubirán" de la S. S. A. no está ajeno a esta necesidad, pues ya en una ocasión anterior logró producir un preparado aceptable a partir de sangre humana y de ave (12), por lo que en esta ocasión se propone preparar dos sangres estabilizadas control por diferentes métodos para evaluarlas,

compararlas y decidir sobre su utilidad en el seguimiento longitudinal de los analizadores de citologías hemáticas.

II.- OBJETIVOS.

A) Preparar sangre humana estabilizada, para utilizarla como material de control de la precisión de analizadores automatizados de canales múltiples, empleados en el laboratorio de hematología, utilizando como modelo el equipo Coulter STKS.

B) Evaluar la precisión interdía de las sangres estabilizadas, mediante su comparación con un control comercial y con el algoritmo de Bull.

III.- MATERIAL Y METODOS.

PREPARACION DE LA SANGRE CONTROL I (SC I).

REACTIVOS:

SOLUCION ELSEVER.

Dextrosa anhidra 34.5 g

Cloruro de sodio 8.4 g

Citrato trisódico 16.0 g

Acido cítrico 1.0 g

Aforar a 2000 mL con agua bidestilada, filtrar con doble papel
Whatman 42.

SOLUCION FIJADORA DE CELULAS HUMANAS.

Solución Alsever 250 mL

Glutaraldehído 1.6 mL

Mezclar perfectamente antes de su uso.

PAQUETE GLOBULAR RECONSTITUIDO.

Paquete globular* 250 mL

Sol. salina isotónica estéril 250 mL

*Paquete globular próximo a vencerse donado por el Banco de
Sangre del INNSZ.

OTROS:

EDTA disódico	20 mg/mL
Succinato de cloromicetina	50 µg/mL
Sulfato de neomicina	170 µg/mL
Sangre de pollo	5 mL

SOLUCION FIJADORA DE ERITROCITOS DE AVE (21).

Sol. salina isotónica	100 mL
Fosfato de potasio monobásico 0.15 M	24 mL
Fosfato de sodio dibásico 0.15 M	76 mL
Formaldehído al 36% w/v	20 mL

AMORTIGUADOR SALINA - FOSFATOS.

Sol. salina isotónica	100 mL
Fosfato de potasio monobásico 0.15 M	24 mL
Fosfato de sodio dibásico 0.15 M	76 mL

METODO: (NEVILL - HALL).

Un paquete globular próximo a vencerse procedente del banco de sangre, se reconstituye con 250 mL de solución salina isotónica estéril y se filtra como para transfusión empleando un filtro Hemoset de Abbott, y se recibe en un matraz de bola de fondo plano de 1000 mL, se le añade lentamente la solución fijadora de glutaraldehído manteniendo un movimiento constante pero cuidadoso, continuándolo hasta 30 seg después de concluir la adición. Se fracciona la sangre en tubos de plástico de 50 mL para centrifuga y se centrifuga a 1800 G en

centrífuga refrigerada a 4°C durante 15 min. Se desecha el sobrenadante de cada tubo utilizando un sistema de vacío, procurando eliminar la capa leucocitaria. El paquete de cada tubo se lava tres veces con solución Alsever estéril y se juntan en un solo recipiente. Se calcula aproximadamente el volumen final del paquete globular y se le determina la concentración de hemoglobina. Con este dato, se calcula el volumen de solución alsever que se necesita añadir para obtener una suspensión con una concentración de hemoglobina entre 12.0 y 13.0 g/dL. El volumen total será: el paquete globular más la solución Alsever de adición, y en base a éste deben calcularse las cantidades necesarias de EDTA disódico, succinato de cloromicetina y sulfato de neomicina en las proporciones ya mencionadas que se disolverán en la solución Alsever de adición, se filtra por Whatman 42 antes de agregarse al paquete globular.

Por otro lado, el día anterior a la preparación de la sangre control, debe efectuarse la fijación de eritrocitos de ave (pollo) de la siguiente manera: se obtienen 5 mL de sangre de pollo con EDTA (1.5 mg/mL). Mediante frotis teñido con colorante de Wright, se corrobora, por apreciación morfológica al microscopio, la integridad de los eritrocitos de ave. Se obtiene el paquete globular por centrifugación y a 2 mL de éste se le añaden lentamente y con agitación continua, 40 mL de solución fijadora ; finalizada la adición, se dejan reposar 20 horas a 4°C. Posteriormente, se lavan 4 veces con amortiguador de salina - fosfatos y se almacenan en suspensión al 50% con solución Alsever hasta su uso.

Cabe hacer mención, que se aprovechan las características de los eritrocitos de ave de ser células nucleadas y poseer diámetro semejante al de los glóbulos blancos humanos para que, después del proceso de fijación, sirvan como substitutos de leucocitos.

En base al volumen total de sangre humana fijada, se calcula el volumen de eritrocitos de ave fijados que es necesario agregar para obtener una cuenta final de "leucocitos" entre 7000 y 9000/ μ L. Después de la adición, se mezcla perfectamente la suspensión y se deja reposar 72 horas a 4°C. Transcurrido el tiempo, se deja que la suspensión adquiera la temperatura ambiente y se mantiene en agitación suave y constante con la ayuda de un agitador magnético, por aproximadamente una hora. Empleando un dilutor automático (Clinicon diluter), con volumen ajustado a 2 mL, se distribuye la sangre en tubos de 12 x 75 mm. Los tubos tapados se conservan a 4°C hasta su uso.

La adición de los eritrocitos de ave fijados a la SC I se efectuó 15 días después de su preparación ya que hubo contratiempos para conseguir la sangre de pollo. El proceso de fijación le confiere a los eritrocitos de ave una consistencia viscosa y pegajosa que dificulta su manipulación, ésto, posiblemente influyó en que se adionaran una mayor cantidad de células a la SC I obteniéndose una cifra de "leucocitos" de 12 500/ μ L.

Debido a las concentraciones de glutaraldehído y formaldehído utilizadas en la preparación de la SC I, ésta adquiere una consistencia muy

pegajosa por el efecto que tienen estos agentes fijadores sobre las membranas y matriz celulares, por lo que se sugiere prolongar el tiempo de mezclado, previo a la medición por el analizador, hasta por 30 minutos para evitar en lo posible la formación de agregados eritrocitarios.

PREPARACION DE LA SANGRE CONTROL II (SC II).

REACTIVOS:

SOLUCION FIJADORA.

Formaldéhidó al 37 %	6.75 mL
Glutaraldehído al 50 %	0.75 mL
Citrato trisódico	26 g
Agua destilada	100 mL

OTROS:

Cloromicetín 40 mg/L de sangre

METODO: (REARDON Y COL.).

Se utiliza una unidad de sangre completa de menos de 48 horas de extraída. Se filtra como para transfusión empleando un filtro Hemoset de Abbott y se recibe en un vaso de precipitados de 1000 mL, se calcula el volumen aproximado. Se añade la solución fijadora (1 parte por cada 50 partes de sangre) lentamente a la sangre manteniéndola en agitación constante; en esta solución

se disuelve previamente el antibiótico. Se mantiene en agitación por una hora a temperatura ambiente y se deja reposar durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se deja que adquiera la temperatura ambiente y se mezcla durante una hora, utilizando un agitador magnético. Se fracciona en tubos de 12 x 75 mm con un volumen de 2 mL utilizando el mismo sistema que para la sangre control I. Los tubos tapados se conservan a 4°C hasta su uso.

EVALUACION DE LAS SANGRES CONTROL.

ABREVIATURAS Y SIGNIFICADO:

GB = Cuenta total de leucocitos ($\times 10^9/L$)

GR = Cuenta total de eritrocitos ($\times 10^{12}/L$)

Hb = Concentración de hemoglobina (g/dL)

Hto = Hematocrito (%)

VGM = Volumen globular medio (fL)

HCM = Hemoglobina corpuscular media (pg)

CHCM = Concentración media de hemoglobina corpuscular (g/dL)

ADE = Amplitud de distribución de eritrocitos (%)

PI = Cuenta total de plaquetas ($\times 10^9/L$)

VPM = Volumen plaquetario medio (fL)

CV = Coeficiente de variación

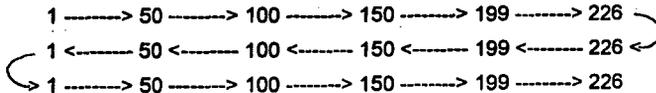
X = Promedio

DE = Desviación estándar

SANGRE CONTROL I.

ESTABILIZACION DEL VOLUMEN GLOBULAR MEDIO: Se separaron dos alícuotas de 5 mL y se procesaron en el analizador tres veces por semana, durante un mes, para determinar la estabilidad del VGM en por lo menos tres mediciones consecutivas.

HOMOGENEIDAD DE LOTE Y PRECISION INTRADIA: Se valoró la homogeneidad del lote de SC I constituido por 226 tubos de la siguiente forma: se tomaron los tubos 1, 50, 100, 150, 199 y 226 que fueron analizados bajo el esquema conocido como muestreo en "culebra". Se midieron en el analizador Coulter STKS en el orden que fueron tomados para después analizarse en orden inverso y finalizar de nuevo en orden ascendente como lo indica el siguiente esquema:



Se calculó el CV en todas las muestras.

PRECISION INTERDIA: Se incluyó un tubo de muestra de SC I diariamente al final de cada jornada de trabajo durante 225 días consecutivos, acumulándose 154 determinaciones correspondientes a los días laborables del periodo

mencionado, cada tubo duró de 4 a 5 días. De cada parámetro se obtuvieron los CVs correspondientes así como las gráficas de Levey - Jennings. Se incluyó al inicio de la corrida diaria (en los períodos en los que fue surtido) el control comercial 4C (Coulter). Además, diariamente, se obtuvo el algoritmo de Bull (dato proporcionado por el equipo).

SANGRE CONTROL II.

Se siguió la indicación de los autores de utilizar inmediatamente el preparado, ya que el VGM no necesita tiempo de estabilización (13).

PRECISION INTRADIA (COMPARACION CON UNA SANGRE FRESCA): Se utilizaron tres tubos de SC II y la sangre fresca (SF) de un donador sano distribuida homogéneamente en tres tubos de 12 x 75 mm y se midieron en el analizador.

Se colocaron los tubos en una gradilla para muestras de manera alterna (SF 1 - SC II - SF 2 - SC II - SF 3 - SC II) y se midieron 5 veces sin variar el orden de los tubos. Se calcularon los CVs de los parámetros de la biometría, tanto para la sangre fresca como para la SC II.

HOMOGENEIDAD DEL LOTE Y PRECISION INTRADIA: Se evaluó la homogeneidad del lote de SC II constituido por 296 alícuotas. Se tomaron los tubos 1, 50, 100, 150, 200, 250 y 296, se siguió el esquema de muestreo en "culebra" como con la SC I, pero esta vez se midieron dos veces en cada sentido

de manera alterna teniendo al final cuatro mediciones para cada tubo. Se calculó el CV de cada parámetro.

PRECISION INTERDIA: Durante la jornada de trabajo, se intercaló un tubo de SC II cada 24 especímenes del día, iniciando como muestra 0. Se utilizó un tubo cada día hasta agotarse y si era necesario se utilizaban dos, cubriendo así toda la corrida del día. Esta rutina se siguió hasta que el lote se consumió (192 días consecutivos). Se calcularon los CVs interdía y se elaboraron las gráficas de Levey - Jennings de cada parámetro. Durante el periodo de evaluación, se obtuvieron 132 datos para cada medición correspondientes a los días laborables.

IV.- RESULTADOS.

ESTABILIZACION DEL VGM DE LA SC I: Se inició con un valor de VGM igual a 93.2 fL y se consideró que entre los días 17 y 23, el VGM adquirió un valor estable que osciló entre 83.8 fL y 84.8 fL.

HOMOGENEIDAD DEL LOTE Y PRECISION INTRADIA: En la tabla 1 se presentan los CVs para cada una de las mediciones realizadas en la SC I y en la SC II. Para todas las mediciones se obtuvieron CVs inferiores en la SC II, y todos estuvieron dentro de los valores de reproducibilidad en sangre fresca reportadas por Wintrobe (22). En la SC I los CVs encontrados para GB, GR, y CMHC estuvieron ligeramente por arriba de los informados por Wintrobe.

COMPARACION DE LA PRECISION INTRADIA DE UNA SANGRE FRESCA CON LA DE LA SC II: En la tabla 2 se puede apreciar que la precisión obtenida para todas las mediciones de la SC II es prácticamente idéntica a la de una sangre fresca y en consecuencia el proceso de fijación no modificó el comportamiento de la misma.

PRECISION INTERDIA: Comparando la precisión obtenida para las diferentes mediciones en las 2 sangres control (Tabla 3) el CV para hemoglobina fue muy similar en ambas, para GB, GR y HCM fue superior la SC II, mientras que para hematocrito, VGM y CMHC se obtuvo menor CV en la SC I.

Durante el estudio, se incluyeron 4 lotes de sangre control 4C (Nos. 701, 709, 715 y 793). Dado que los valores de 4C para las diferentes mediciones varía de lote a lote, se calculó para cada medición el valor observado entre el valor meta x 100 (Tabla 4); los promedios así obtenidos para cada una de las mediciones estuvieron dentro de los límites de variación aceptados por el fabricante, exceptuando el correspondiente a plaquetas que fue el que más se alejó del 100%; sin embargo, quedó dentro de los límites especificados ($88.1\% \pm 11.9\%$).

Con los 5 a 7 promedios diarios obtenidos mediante el algoritmo de Bull en lotes de 20 pacientes, se calculó cada día el promedio aritmético para cada uno de los tres índices eritrocíticos. El promedio global para estos índices fue: VGM = 89.8 ± 0.82 fL, HCM = 29.84 ± 0.51 pg, CMHC = 33.18 ± 0.48 g/dL. Los CV fueron 0.9%, 1.7% y 1.4% respectivamente.

TABLAS.

TABLA 1. Homogeneidad del lote y precisión intradía (CV) en cada una de las mediciones de la SC I y de la SC II.

MEDICION	SC I	SC II	WINTROBE
GB	2.5	1.7	2.0
GR	1.2	0.6	1.0
Hb	0.7	0.5	—
Hto	1.3	0.6	—
VGM	0.5	0.2	<1.0
HCM	1.5	0.6	1.5
CMHC	1.4	0.6	1.0
ADE	—	1.2	—
PI	—	2.4	4.0
VPM	—	1.2	—

TABLA 2. Comparación de la precisión intradía de una sangre fresca con la de la SC II.

MEDICION	SC II	CV %	S F
GB	1.8		1.8
GR	0.6		0.4
Hb	0.7		0.6
Hto	0.7		0.5
VGM	0.3		0.3
HCM	0.5		0.5
CMHC	0.7		0.6
ADE	1.2		1.2
PI	1.7		2.0
VPM	1.2		0.9

TABLA 3. Coeficientes de variación y promedios obtenidos para cada medición del análisis de precisión inter día de las SC I y SC II.

MEDICION	SC I		SC II	
	X	CV	X	CV
GB	12.25	4.2	7.87	0.9
GR	4.19	1.8	5.03	0.9
Hb	12.37	0.9	14.82	1.1
Hto	35.94	2.8	48.89	3.2
VGM	85.51	1.3	96.91	2.8
HCM	29.53	2.3	29.52	1.7
CMHC	34.46	3.2	30.47	4.2
ADE	—	—	14.32	6.8
PI	—	—	229.8	2.0
VPM	—	—	8.15	8.2

TABLA 4. Oscilación de los valores asignados a las diferentes mediciones en los 4 lotes de sangre control 4C. Promedio (X) en cifras porcentuales, desviación estándar (DE) y coeficientes de variación en las 80 comidas.

MEDICION	OSCILACION	X	DE	CV
GB x 10 /L	8.7 - 9.3	97.3	1.176	1.2
GR x 10 /L	4.19 - 4.23	100.6	0.954	0.9
Hb g/dl	12.2 - 12.7	99.5	0.586	0.6
Hto %	35.3 - 36.3	101.8	0.922	0.9
VGM fL	83.6 - 86.2	101.2	0.355	0.4
HCM pg	28.9 - 30.1	99.0	0.968	0.9
CMHC g/dL	34.6 - 35.5	97.8	0.969	0.9
ADE %	13.3 - 15.3	99.5	1.941	2.0
PI x 10 /L	207 - 212	108.5	4.308	4.0
VPM fL	10.5 - 10.6	103.1	1.464	1.4

GRAFICAS.

Se elaboraron las gráficas de Levey - Jennings de precisión interdiaria de las sangres control I y II, control comercial 4C y algoritmo de Bull (en los índices eritrocíticos) integradas por parámetro, para facilitar la comparación (figuras 1 a 9). En estas gráficas se encuentran marcados los límites de tolerancia aceptados por el fabricante para cada una de las mediciones de la sangre control 4C, así como también, el 3% de variación aceptado por Bull para el algoritmo.

En las figuras 1 a 9 se puede observar, que el control 4C se incluyó únicamente en 80 corridas de las 154 determinaciones de la SC I y en 72 corridas de las 132 determinaciones que se le practicaron a la SC II, esto se debió al irregular abastecimiento del mencionado control.

El control comercial mostró valores fuera de lo permisible, únicamente en el recuento plaquetario (fig. 9).

En cuanto al algoritmo de Bull, el VGM (fig. 5) se mantuvo estable y dentro de los límites $\pm 3\%$ durante el período de estudio; sin embargo, en la HCM (fig. 6a) y en la CMHC (fig. 7) se observó un descenso entre las corridas 80 y 135, para ascender de nuevo y recuperar los valores iniciales. Esta conducta se podría explicar por una descalibración en la medición de la Hb (numerador en la fórmula que se emplea para el cálculo de los dos índices); esto no se manifiesta en los valores de la Hb del control 4C pero sí en los de las SC I Y SC II.

En las figuras 1, 2 y 3 se observa que las sangres preservadas mantienen una conducta estable, salvo algunos valores dispares al final del estudio de la SC I en la medición de Hb, así como en los leucocitos después de la corrida 130.

El VGM (fig. 5), fue el parámetro que más inestabilidad mostró en las sangres preservadas, el cual mantuvo una conducta de continuo ascenso más notoria en la SC II; esto condujo a que los parámetros derivados del VGM como el hematocrito ($VGM \times GR$) y la CMHC ($Hb \times 100/VGM \times GR$) mostraran ascenso y descenso respectivamente (fig. 4 y 7).

La HCM (fig. 6b) mantuvo un comportamiento muy parecido en ambas sangres control, mostrando un descenso entre los días 80 y 135 y recuperándose al final, conducta también observada en el algoritmo de Bull (fig. 6a) para los mismos días.

Respecto a las plaquetas (fig. 9), éstas se muestran más estables en la SC II que en control 4C.

La ADE (fig. 8), de la SC II, mantuvo un comportamiento de continuo ascenso durante el período de evaluación.

Comparando los CVs obtenidos de ambas sangres control de la precisión interdía (tablas 3 y 4), se observa que son muy similares en la Hb, que

para GR, GB y HCM son inferiores en la SC II mientras que para VGM y CMHC se obtuvieron valores menores de CVs en la SC I.

El comportamiento del VGM fue inestable en ambas sangres preservadas, siendo más marcado en la SC II; esto, posiblemente se debió, a una fijación incompleta de los eritrocitos que inestabilizó a las membranas.. Debido a esto, se decidió preparar una tercera sangre preservada (SC III) empleando el método de fijación de Reardon DM y cols. y utilizando una fuente diferente de glutaraldehído (polvo en vez de solución). Los resultados parciales de la evaluación de precisión interdía durante 54 corridas, se muestran en las figuras 10 a 14 en forma de gráficas de Levey - Jennings.

En la fig. 12, se observa que el VGM muestra un ascenso en las primeras 6 corridas (de 95 a 99 fL) para después estabilizarse hasta la corrida 54.

La Hb, los GR y la ADE (fig. 10 a 12) se muestran muy estables hasta el último día de evaluación.

En la fig. 13, se observa que la conducta de las plaquetas es similar tanto para la SC III como para el control 4C, que hacia la corrida 26 presenta un descenso y que corresponde a una recalibración del equipo para esta medición.

GRAFICAS

HEMOGLOBINA

SC I □

SC II +

CONTROL 4C △

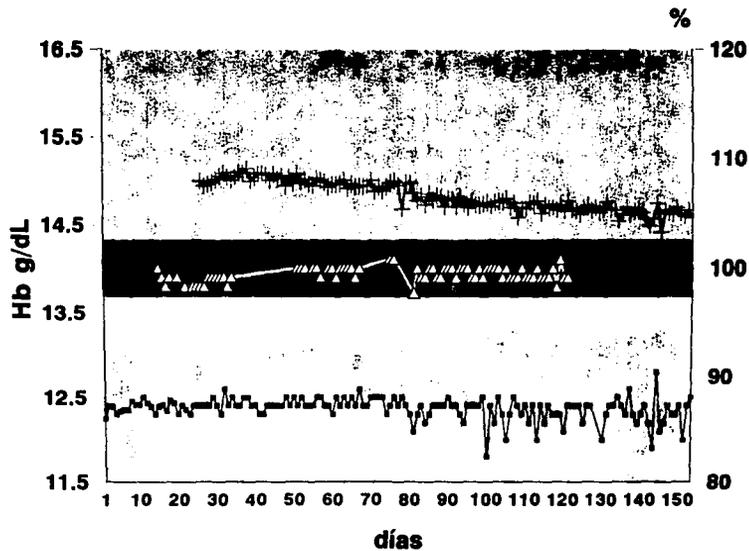


Figura 1

LEUCOCITOS

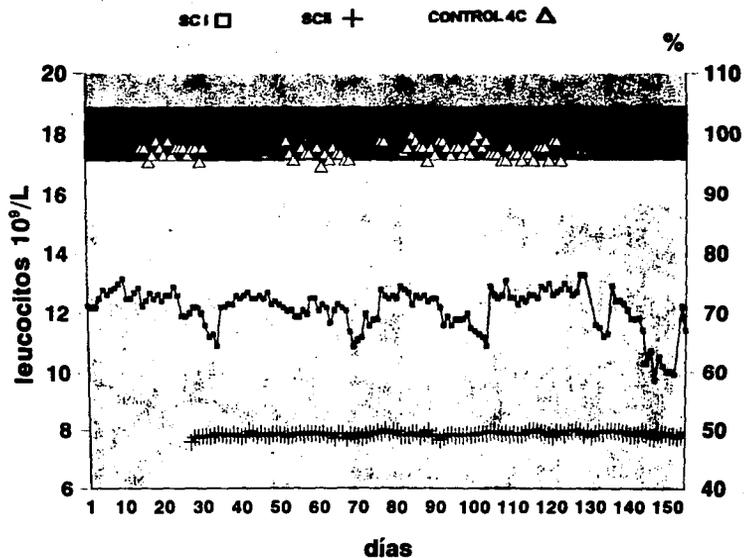


Figura 2

GLOBULOS ROJOS

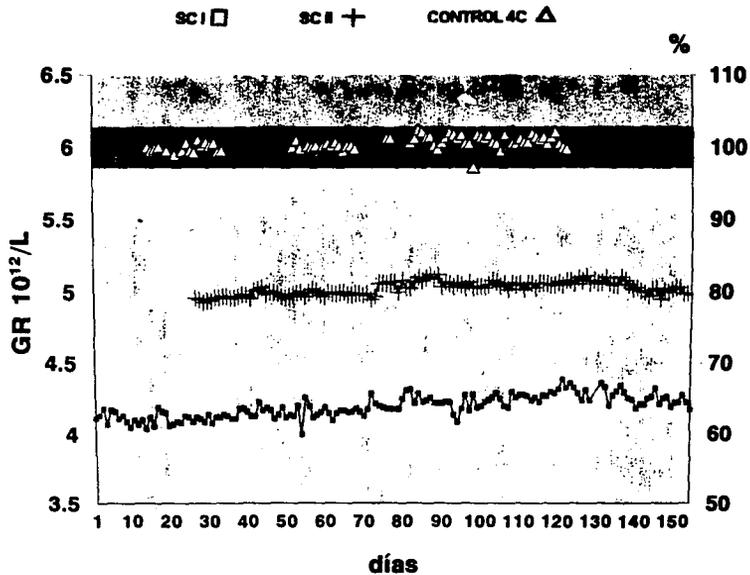


Figura 3

HEMATOCRITO

SC I □

SC II +

CONTROL 4C △

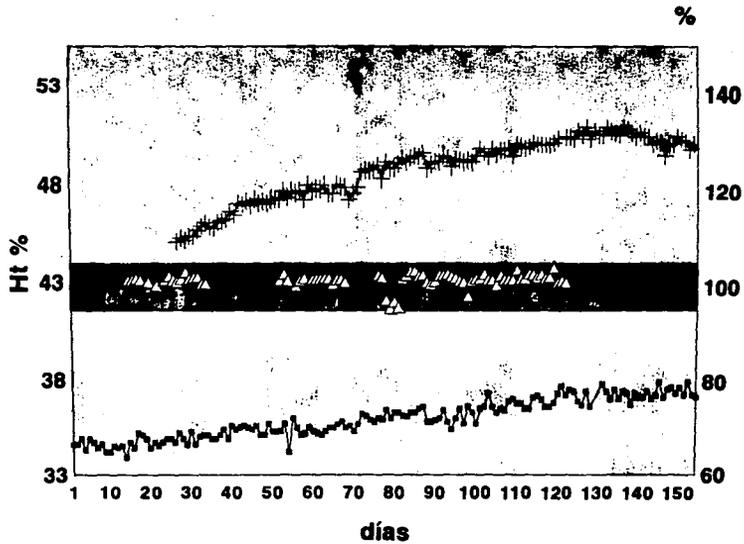


Figura 4

VOLUMEN GLOBULAR MEDIO

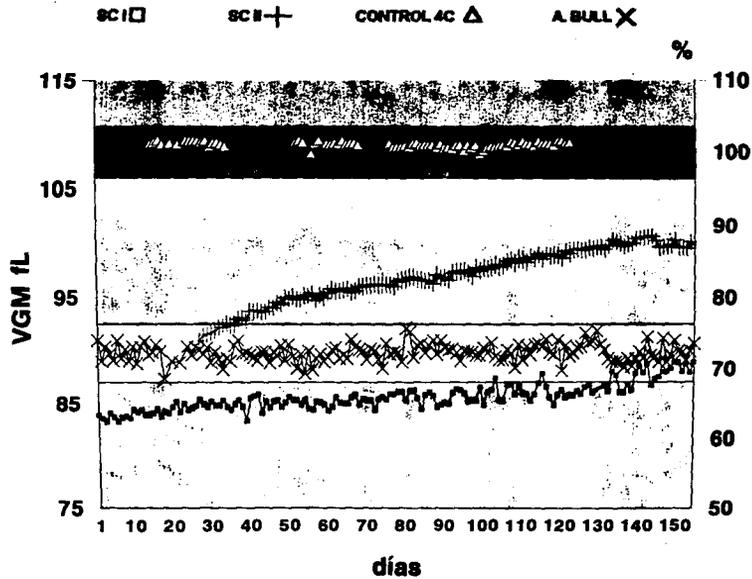


Figura 5

HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA

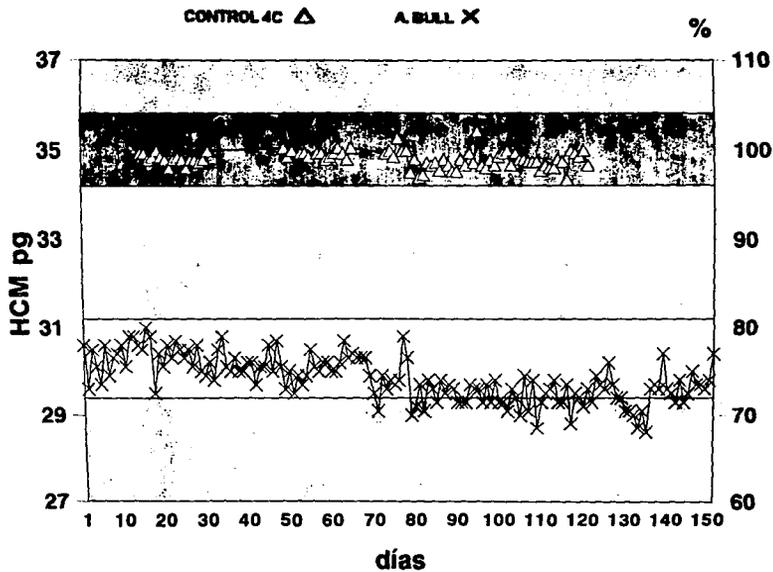


Figura 6a

HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA

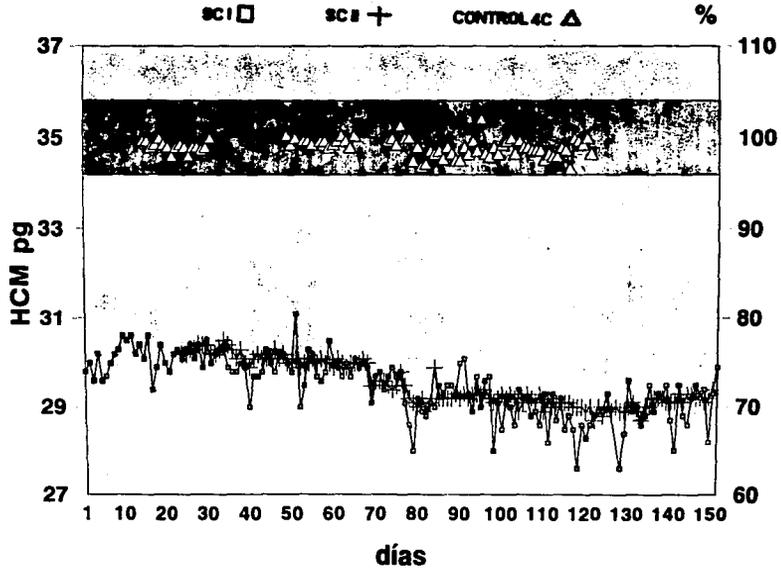


Figura 6b

CONCENTRACION MEDIA DE Hb CORPUSCULAR

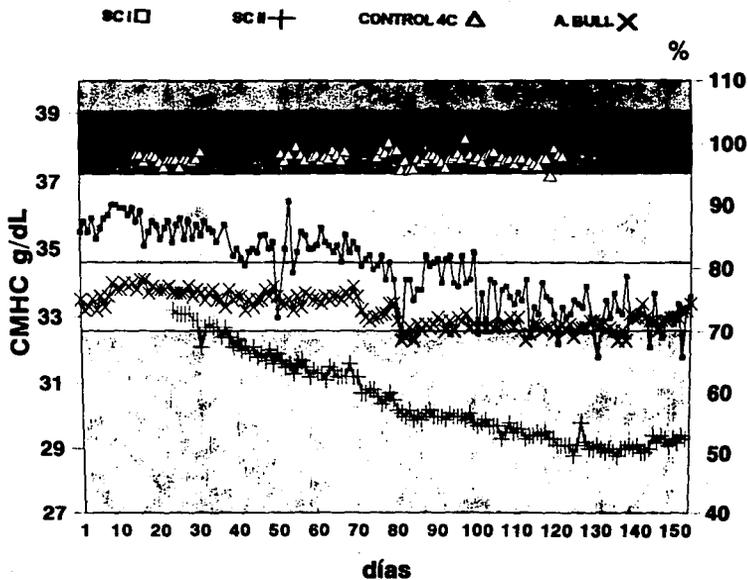


Figura 7

AMPLITUD DE LA DISTRIBUCION DE LOS ERITROCITOS

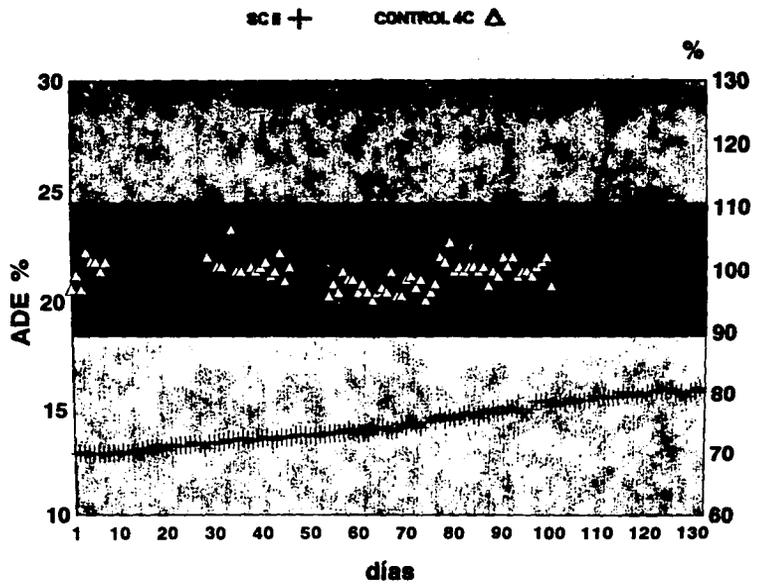


Figura 8

PLAQUETAS

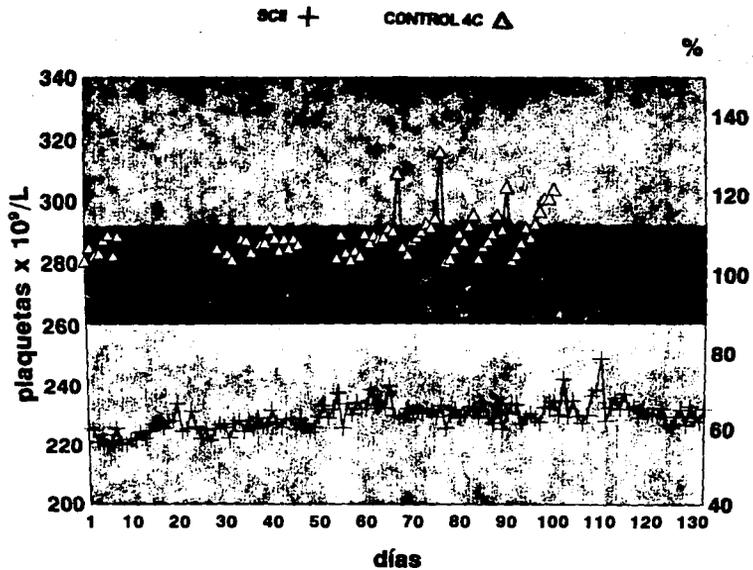


Figura 9

HEMOGLOBINA

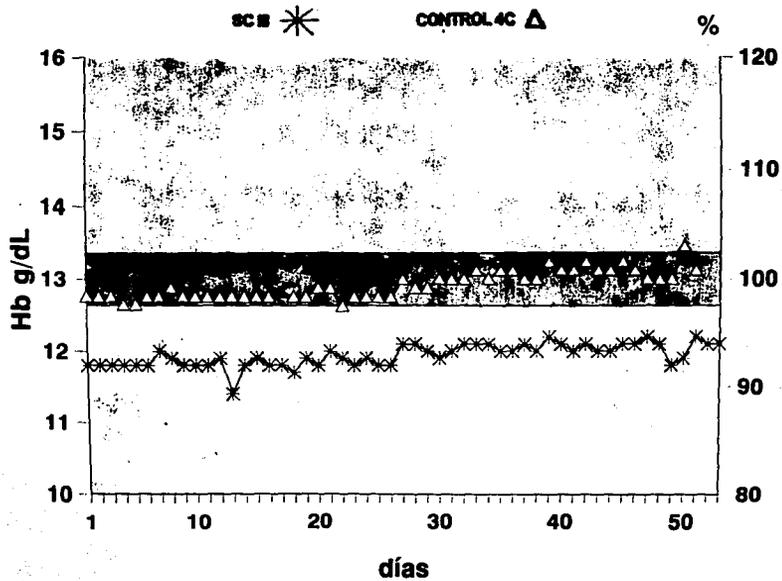


Figura 10

GLOBULOS ROJOS

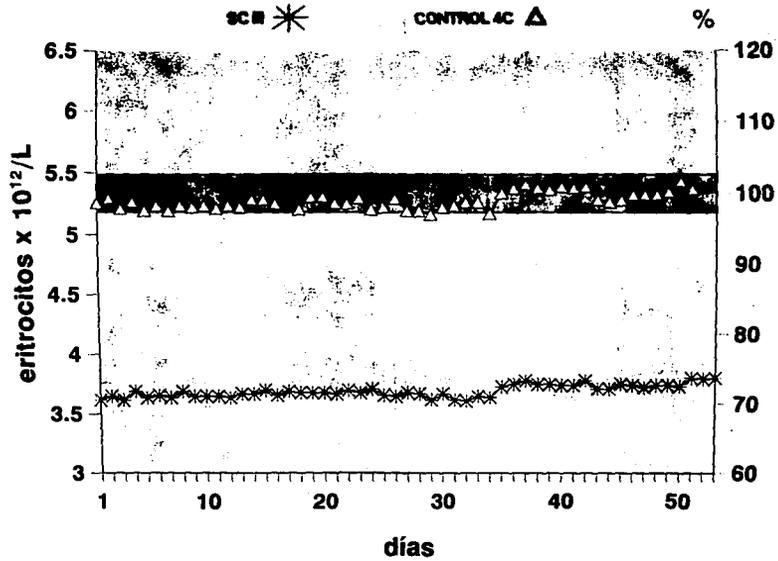


Figura 11

VOLUMEN GLOBULAR MEDIO

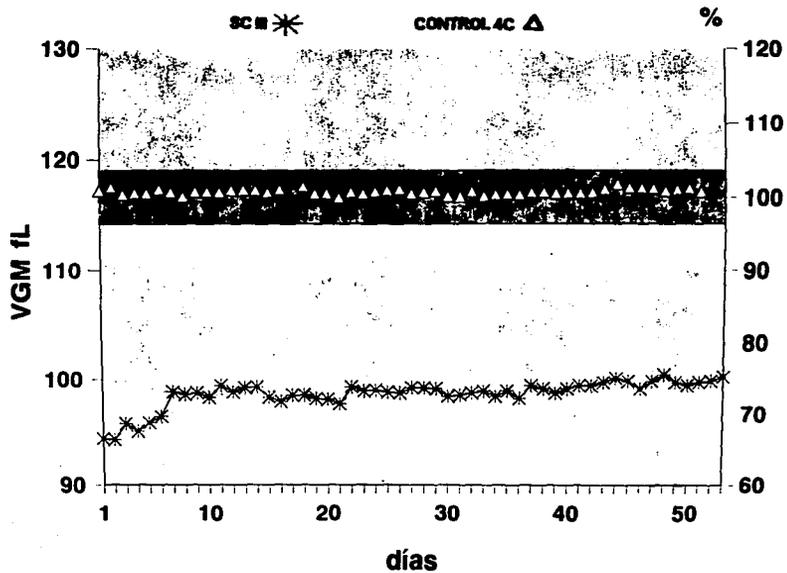


Figura 12

PLAQUETAS

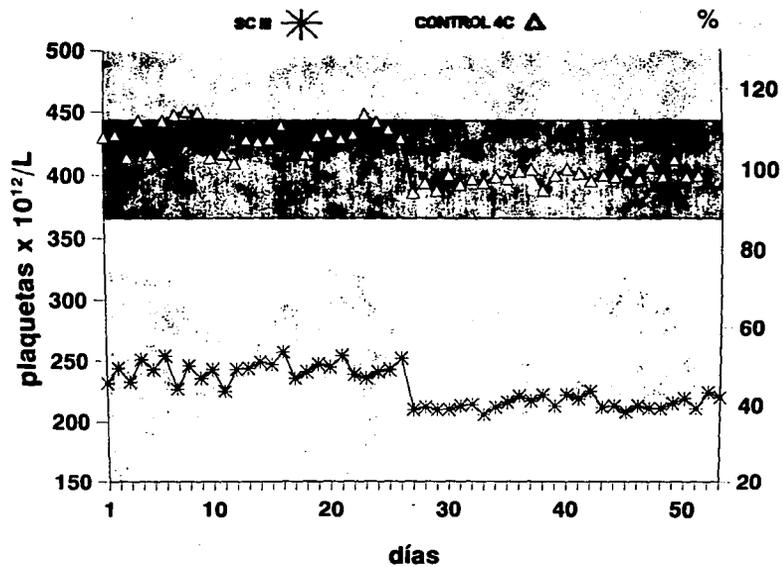


Figura 13

AMPLITUD DE LA DISTRIBUCION DE LOS ERITROCITOS

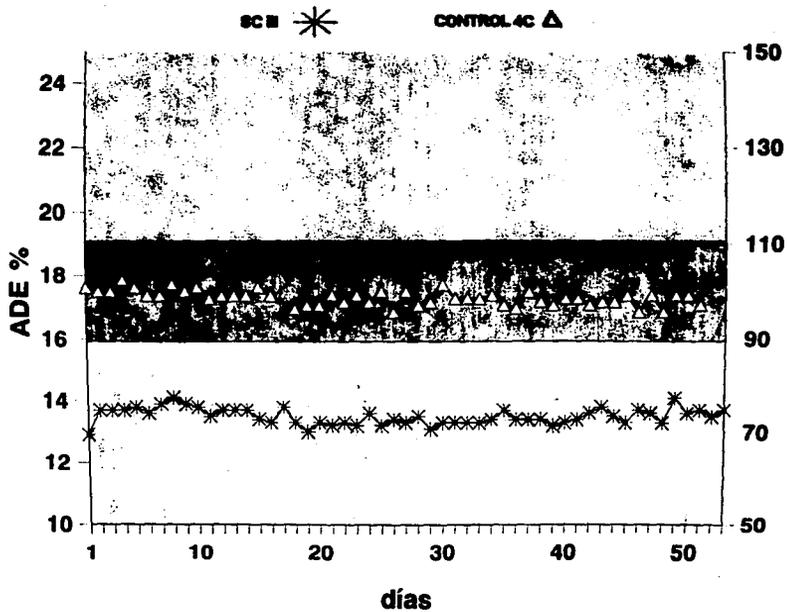


Figura 14

V.- DISCUSION.

Los autoanalizadores de hematología poseen un sistema estadístico de autocontrol basado en el modelo matemático diseñado por Bull en 1974 (4); sin embargo, es necesario disponer de otro recurso para el seguimiento del control de los mismos.

En la actualidad, el único material disponible para este fin, es el proveniente de las casas comerciales pero adolece de los siguientes inconvenientes: inconstancia en el abastecimiento, corta vigencia (aproximadamente un mes) y alto costo debido a que son materiales de importación. Esto último se acompaña de los consecuentes problemas aduanales y de almacenamiento mientras los controles llegan a nuestras manos.

En la presente tesis se describen 2 métodos de preparación de sangre parcialmente fijada, ambos relativamente sencillos y de bajo costo.

En estas sangres control, se evaluó su estabilidad a largo plazo (7 meses). La estabilidad del equipo Coulter STKS durante el periodo de estudio se controló mediante los valores obtenidos del control comercial 4C normal que, con excepción de las plaquetas, estuvieron siempre bajo control (fig. 1 a 14).

El algoritmo de Bull se mantuvo concordante con el control 4C únicamente en el VGM; los cambios observados en la HCM y CMHC se debieron

posiblemente a una ligera descalibración en la concentración de la Hb que no se reflejó en el control comercial.

Si observamos los datos de precisión intradía (tabla 1), vemos que el comportamiento de la SC II es superior al de la SC I, sus CVs para todos los parámetros oscilaron entre 0.3% y 1.8%, mientras que en la SC I estuvieron entre 0.7% y 2.5%. Como era de esperarse, los CVs intradía fueron más bajos que los de interdía para todas las mediciones tanto en la SC I como en la SC II.

Para la preparación de la SC I se empleó el método del Hospital Nevill Hall que fue utilizado en 1990 por Rosas R y cols. (12), quienes se enfocaron fundamentalmente a evaluar la hemoglobina y los leucocitos (eritrocitos de pollo fijados). Ellos encontraron que a través del tiempo la Hb y los GB aumentaban sus valores y plantean, como posible explicación, la adherencia de eritrocitos a las paredes de los tubos que provocan un atrapamiento de los eritrocitos de pollo fijados debido a la consistencia pegajosa de la sangre tratada con glutaraldehído. Este fenómeno no se observó en la SC I del presente estudio y posiblemente se debió al tiempo de homogeneización de 30 min empleado para evitar en lo posible, la formación de agregados eritrocitarios.

En la literatura se menciona (15 - 20) que en las preparaciones de células estabilizadas, los reactivos empleados para la fijación de las mismas producen cambios en la matriz citoplásmica así como en la capa lipídica de la membrana eritrocitaria provocando un comportamiento celular diferente al de los

eritrocitos no fijados, por lo que la fijación debe ser parcial y controlada. Este fenómeno explica la dificultad de mantener estable el VGM que se manifestó en las SC I y SC II (fig. 5). Al cambiar el glutaraldehído, aparentemente se obtuvo mayor estabilidad en el VGM (fig. 12 y tabla 5). No se tiene la certeza de que la fuente de glutaraldehído (solución) en las sangres control I y II sea la causa de la inestabilidad del VGM pero, es evidente, que la SC III se manifestó como un material de control con una precisión similar a la obtenida por el autor de la técnica (tabla 5) e inclusive mejor que la obtenida por el Laboratorio Nacional de Referencia de la Habana, Cuba (23) en un analizador F - 800 (Sismex - Toa); ambos en períodos de estudio más cortos, 50 y 75 días respectivamente.

Tabla 5. COEFICIENTES DE VARIACION (%) DE SANGRE CONTROL PREPARADA CON EL METODO DE REARDON D M Y COLS.

	REARDON D M	CRUZ C	INNSZ SC II	INNSZ SC III
DIAS	50	75	191	90
GB x 10 ⁹ /L	4.6	2.4	0.9	4.3
GR x 10 ¹² /L	1.3	3.0	0.9	1.9
Hb g/dL	1.1	2.2	1.1	1.1
VGM fL	1.4	---	2.6	0.6
PI x 10 ⁹ /L	3.9	6.8	2.0	2.4
VPM %	5.4	---	8.2	---

VI. CONCLUSIONES.

Con los métodos empleados para la preparación de sangre control de Nevill Hall y Reardon DM y cols., se obtuvieron materiales estables por 6 a 7 meses; sin embargo, consideramos que la sangre control obtenida por el método de Reardon DM es más conveniente por lo siguiente:

- a) El procedimiento de preparación es más sencillo.
- b) El tiempo requerido para la estabilización inicial del VGM es de 6 días comparado con los 20 días en el método de Nevill Hall.
- c) La consistencia de la sangre control es muy similar a la de una sangre fresca, mientras que la obtenida por el método de Nevill Hall es muy viscosa lo que obliga a homogeneizar durante 30 min antes de efectuar las mediciones.
- d) Permite controlar la cuenta plaquetaria así como el VPM a diferencia de la de Nevill Hall en la que se eliminan las mismas.

Para que el material sea útil no sólo para el control de la precisión de los autoanalizadores sino también de la exactitud de los mismos, es necesario asignar valores a la sangre. Con este objeto, se está empleando el método de consenso en el que están participando los laboratorios de 9 Institutos Nacionales de Salud.

VII. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Lewis S M. Garantía de calidad en hematología. *Bioquímica* 1990; XV 60: 18 - 32.
- 2.- Charache S. Automation in the Hematology Laboratory. The year book of Hematology. Jerry L. Spivak. Year Book Medical Publishers, Inc. ,1990, 127 - 139.
- 3.- O'Sullivan M B. Quality control of multichannel haematology analysers: critique of current methods and the need for performance goals. *Clin lab Haemat* 1990, 12, Suppl 1: 3 - 12.
- 4.- Bull B S, Elashoff R M, Heilbron D C, Couperus J. A study of various estimators for the derivation of quality control procedures from patient erythrocyte indices. *Am J Clin Pathol* 1974; 61: 473 - 481.
- 5.- Hackney J R, Cembrowski G S. The use retained patient specimens for hematology quality control. *Clin lab Haemat* 1990; 12, Suppl 1: 83 - 89.
- 6.- Levy W C, Hay K L, Bull B S. Preserved blood versus patient data for quality control - Bull's algorithm revisited. *Am J Clin Pathol* 1986; 85: 719 -721.
- 7.- Levy W C, Bull B S, Koepke J A. The incorporation of red blood cell index mean data into quality control programs. *Am J Clin Pathol* 1986; 86: 193 - 199.
- 8.- Vives i Corrons J LI, Aguilar i Bascompte J LI. Control de calidad y expresión de los resultados en hematología. *Manual de técnicas de laboratorio en hematología*. Salvat Editores, S. A., 1987, 21 - 43.

- 9.- Lunetzky E S, Cembrowski G S. Performance characteristics of Bull's multirule algorithm for the quality control of multichannel hematology analyzers. *Am J Clin Pathol* 1987; 88: 634 - 638.
- 10.- Koepke J A, Protector T J. Quality assurance for multichannel hematology instruments. Four years' experience with patient mean erythrocyte indices. *Am J Clin Pathol* 1981; 75: 28 - 33.
- 11.- Lappin T R J, Farrington C L, Nelson M G, Merret J D. Intralaboratory quality control of hematology. Comparison of two systems. *Am J Clin Pathol* 1979; 72: 426 - 431.
- 12.- Rosas Romero R, Loria A. Materiales de control II. Evaluación de un control leucocitario casero. *Lab - acta* 1990; 2/2: 35 - 38.
- 13.- Reardon D M, Mack D, Warner B, Hutchinson D. A whole blood control for count analyzers, and source material for an external quality assessment scheme. *Med Lab Sci* 1991; 48: 19 - 26.
- 14.- Lappin T R J, Sanderson F M. An artificial leucocyte control suspension. *J Clin Pathol* 1970; 23: 65 - 67.
- 15.- Ham A W, cap. 1. Histology. VII Ed. J B Lippincott Company, 1974, pp 7 - 8.
- 16.- White A, Handler P, Smith E L. The Proteins. III Ed. Principles of Biochemistry. McGraw - Hill Book Co. 1964, pp 108.
- 17.- Ballas S K. Spectrin autoantibodies in normal human serum and in polyclonal blood grouping sera. *Br J Haemat* 1989; 71: 137 - 139.
- 18.- Moskowitz M. Surface alteration and the agglutinability of red cells. *Nature* 1957; 180: 1049 - 1050.
- 19.- Avrameas S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. *Immunochemistry* 1969; 6: 43 - 52.

- 20.- Walsh G, Headon D. Proteins for diagnostic purposes. *Protein Biotechnology*. Baffins Lane, Chichester Engl. John Wiley and Sons, 1994, pp 289.
- 21.- Mollison P. L. cap. 10. Blood transfusion in *Clinical Medicine*. V Ed. Blackwell Scientific Publications, 1974, pp 452.
- 22.- Lee G R, Bithell T C, Foerster J, Athens J W, Lukens J N. Principles of hematologic examination. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 9th ed. Malvern, Philadelphia: Lea & Febiger, 1993: 12, 15.
- 23.- Lee Rodríguez S, Colina Rodríguez A, del Portillo I. Recomendaciones para la preparación fácil y rápida de un material de control estable para hematología. *Bioquímica* 1994; 126 - 129.