

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

### COMPARISON PLATELET COUNT, USING DIFFERENT METHODOLOGIES, IN PATIENTS WITH THROMBOCYTOPENIC PURPURA AND MYELODYSPLASTIC SYNDROMES

NORIELIS ZABALA, ERIKA HANNAOUI

Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Escuela de Ciencias, Departamento de Bioanálisis, Cumaná, Venezuela. E-mail: norizag\_25@hotmail.com / erikajhr@yahoo.com

#### RESUMEN

Se valoró el conteo plaquetario de tres grupos de pacientes, de acuerdo al método manual de Brecher y Cronkite y al método 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). Los pacientes con púrpura trombocitopénica (PT) y síndromes mielodisplásicos (SMD), proviniendo de la consulta de hematología del Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá" (HUAPA) de la ciudad de Cumaná, Venezuela. Para tal fin, se tomaron muestras de sangre a pacientes de ambos géneros, 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 con un intervalo de confianza de 95%, arrojando diferencias significativas en los pacientes con PT y SMD, tanto por el método manual como por los distintos automatizados ( $p < 0,05$ ) y correlación positiva; en cambio, en el grupo control no se obtuvieron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Tomando en cuenta los resultados obtenidos, se puede considerar como válidos los recuentos realizados por los diversos métodos, tanto para pacientes con un conteo de plaquetas dentro del intervalo de referencia, como por debajo del mismo.

**PALABRAS CLAVE:** Púrpura trombocitopénica, síndromes mielodisplásicos, conteo de plaquetas.

#### ABSTRACT

Platelet count was assessed in three groups of patients, according to the manual method of Brecher and Cronkite and the automated hematology analyzers using different principles: Swelab ALFA (impedance), Cell-dyn 3200 (flow cytometry) and Beckman Coulter LH 500 (volumetric impedance, radio frequency and laser light scattering). The patients with thrombocytopenic purpura (PT) and myelodysplastic syndromes (MDS), came from the hematology consultation at University Hospital "Antonio Patricio de Alcalá", Cumaná. For that purpose, blood samples were taken from patients of both sexes, aged between 15 and 50 years, and diagnosed with these diseases. In addition, 20 individuals were taken from the consultation above, without alterations in the number of platelets, as control group. The results were subjected to analysis of variance and correlation at 95% confidence, throwing significant differences in patients with PT and SMD, both from the manual method and by the various automated procedures ( $p < 0.05$ ) and a positive correlation; whereas in the control group no significant differences were obtained ( $p > 0.05$ ). Taking into account the results obtained, it can be considered as valid the counts made by the various methods under study, both, for patients with a number of platelet within reference values, as well as below it.

**KEY WORDS:** Thrombocytopenic purpura, myelodysplastic syndromes, platelet count.

#### INTRODUCCIÓN

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. 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). 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 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 *et al.* 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).

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 Brecher y Cronkite 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 *et al.* 2007).

El principio de impedancia, patentado por Coulter, fue el primer método automatizado para el recuento de plaquetas (Sandhaus *et al.* 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 *et al.* 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. Algunos estudios parecen indicar que los métodos para cuantificar plaquetas mediante el principio óptico pueden ser más exactos que los métodos de impedancia (Sandhaus *et al.* 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 *et al.* (1987) de dicha técnica para el estudio de la sangre completa, fue un paso fundamental para su aplicación clínica. A las células que serán examinadas se les acopla un fluorocromo, generalmente a través de un anticuerpo monoclonal que reconoce una estructura específica en la célula. Posteriormente, las células 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. El

láser, al incidir con cada célula, se desvía y este cambio de dirección es registrado por detectores especiales (Caunedo 2004). Cada uno de los detectores del equipo ofrece una información que es convertida en impulsos eléctricos y posteriormente en códigos digitales que pueden ser visualizados a través de los programas de computación especializados. Este método de análisis, es el único hasta el momento que puede medir la extensión de la activación de plaquetas individuales y detectar subpoblaciones de plaquetas (Caunedo 2004).

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 conteo plaquetario por el método manual y por los métodos automatizados más utilizados en la actualidad, y así aportar más información en este campo tan controversial de la hematología.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 52 muestras sanguíneas de pacientes de ambos sexos que asistieron a la consulta de hematología del HUAPA durante un período de tres meses en el año 2010. Veinte de ellas pertenecieron a pacientes previamente diagnosticados con PT, 12 con SMD y 20 como grupo control. Los análisis se realizaron con muestras anticoaguladas con EDTA-K<sub>3</sub>, obtenidas por veno-punción. Para el conteo plaquetario, se empleó el método manual directo de Brecher y Cronkite (Fragachán 1984) así como tres contadores automatizados con distintos principios: Swelab ALFA (impedancia), CellDyn 3200 (criometría de flujo) y Beckman Coulter LH 500 (impedancia volumétrica, radiofrecuencia y dispersión de luz láser). Además, para cada paciente, se realizó extendidos de sangre coloreados con azul brillante de cresil al 1% (Romero 2009). El estudio estadístico, se efectuó mediante análisis de varianza y correlación al 95% de confiabilidad (Sokal y Rohlf 1981).

La presente investigación se realizó teniendo en consideración las pautas éticas internacionales establecidas por la Organización Mundial de la Salud para trabajos de investigación biomédica en humanos (OMS 2002).

## RESULTADOS

La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos del conteo de plaquetas por el método manual y el equipo automatizado con principio de impedancia, observándose para cada grupo en estudio diferencia estadísticamente

significativa ( $p < 0,05$ ) para cada recuento.

De igual manera, los resultados obtenidos de los conteos plaquetarios para los tres grupos en estudio, analizados mediante metodología manual y equipo automatizado con principio de citometría de flujo, se muestran 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 número de plaquetas en el rango de referencia ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, al estudiar pacientes con un número de plaquetas disminuido se obtuvo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

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	X	DS	F	p
PT	Manual	10-155	109,75	46,851	10,471	< 0,05*
	Impedancia	8-156	108,75	51,980		
SMD	Manual	30-235	95,83	74,430	68,237	< 0,05*
	Impedancia	22-226	93,17	61,532		
Control	Manual	205-425	286,55	70,805	20,347	< 0,05*
	Impedancia	213-410	275,45	61,539		

PT: púrpura trombocitopénica, SMD: síndromes mielodisplásicos

X: media, DS: desviación estándar, F: Fisher, p: significancia; \*:  $p < 0,05$  (significativo)

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 conteo plaquetario	Intervalo	X	DS	F	p
PT	Manual	10-155	109,75	46,851	344,926	< 0,05*
	Citometría de flujo	19-155	109,52	48,810		
SMD	Manual	30-235	95,83	74,430	32,170	< 0,05*
	Citometría de flujo	30-271	107,50	78,762		
Control	Manual	205-425	286,55	70,805	3,098	ns
	Citometría de flujo	223-430	311,55	58,138		

PT: púrpura trombocitopénica, SMD: síndromes mielodisplásicos

X: media, DS: desviación estándar, F: Fisher, p: significancia, \*:  $p < 0,05$  (significativo),

ns: no significativo ( $p > 0,05$ )

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 muestra en la Tabla 3. 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 para los cuales se obtuvo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Tabla 3. Comparación del contejo 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 contejo plaquetario	Intervalo	X	DS	F	p
PT	Manual	10-155	109,75	46,851	19,372	< 0,05 *
	Combinado	13-156	106,30	55,689		
SMD	Manual	30-235	95,83	74,430	7,316	< 0,05 *
	Combinado	30-228	105,33	77,321		
Control	Manual	205-405	286,55	70,805	1,767	ns
	Combinado	203-430	317,90	71,282		

PT: púrpura trombocitopénica, SMD: síndromes mielodisplásicos

X: media, DS: desviación estándar, F: Fisher, p: significancia, \*:  $p < 0,05$  (significativo),

ns: no significativo ( $p > 0,05$ )

## DISCUSIÓN

Tal como muestra la Tabla 1, existe diferencia en el contejo plaquetario de los grupos en estudio al realizarlos por el método manual y automatizado con principio de impedancia. Dicha diferencia, puede deberse a los errores que conllevan la realización de los diferentes pasos en el método manual, lo cual hace que esta técnica posea un coeficiente de variación interlaboratorio del orden del 10 al 25% (Lewis *et al.* 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, microesferocitos), 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 contejo principalmente en casos de trombocitopenia intensa al perderse la linealidad y aumentar el ruido de fondo (Molero *et al.* 2010). Sin embargo, a pesar de estas limitaciones, el contejo 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).

En la Tabla 2 se aprecia que para el grupo con PT se obtuvo diferencia significativa, coincidiendo este resultado con los obtenidos por Latif *et al.* (2003) que reportaron diferencias significativas para el contejo 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 estadística 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 *et al.* 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 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 diferencia estadística significativa obtenida para los grupos con PT y SMD mostrada en la Tabla 3, pudo ser causada por el tamaño de la muestra en estudio; así como por lo explicado por Kaplan *et al.* (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 contejo (Sandhaus *et al.* 2002).

Es importante resaltar, 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, tal como sostienen Molero y Jou (2002). 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.

Con base en 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 Brecher 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.

### 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 los equipos puede ser válido para los conteos bajos de plaquetas, siempre y cuando se mantengan bien calibrados y controlados.

El recuento de plaquetas por el método manual en pacientes con PT y SMD, arrojó una correlación positiva y 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, pudiendo considerarse como una herramienta útil para la confirmación de éstas y otras patologías de índole hematológica.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAUNEDO P. 2004. La citometría de flujo en el estudio de las plaquetas. Disponible en línea en: [http://bvs.sld.cu/revistas/hih/vol20\\_1\\_04/hih04104.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/hih/vol20_1_04/hih04104.htm) (Acceso 22.10.2010).
- DOUGLAS B, CINES M, BLANCHETTE V. 2002. Immune thrombocytopenic purpura. *N. Engl. J. Med.* 346(13):995-1008.
- FERNÁNDEZ N, HERNÁNDEZ P. 1999. Síndrome mielodisplásico. I. Biología y clínica. Disponible en línea en: [http://www.bvs.sld.cu/revistas/hih/vol16\\_1\\_00/hih01100.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/hih/vol16_1_00/hih01100.htm) (Acceso 05.11.2010).
- FRAGACHÁN L. 1984. Manual de hemostasia y coagulación sanguínea, Ediciones de la Biblioteca UCV, Caracas, Venezuela, pp. 134-147.
- FUNDORA T. 1999. Supervivencia de las plaquetas en síndromes mielodisplásicos. Disponible en línea en: [http://bvs.sld.cu/revistas/hih/vol15\\_2\\_99/hih13299.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/hih/vol15_2_99/hih13299.pdf) (Acceso 24.10.2010).
- KAPLAN S, JOHNSON K, WOLFE N. 2001. Validation of low platelet counts from coulter lh 750 and coulter gen s analyzers. *Lab. Haematol.* 7:198-203.
- KNOLL J. 2000. Clinical automated haematology systems. *Rev. Vet. Haematol.* 5:3-11.
- LATIF S, VEILLON D, BROWN D, KALTENBACH J, LINSKOTT A, OBERLE A, COTELINGAM J. 2003. Spurious automated platelet count enumeration of yeast forms as platelets by the cell-dyn 4000. *Am. J. Clin. Pathol.* 120(6): 882-885.
- LEITE L, SILVA M, MIRANDA M. 2007. Comparação entre a contagem de plaquetas pelos métodos manual e automatizado. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 8:106-114.
- LEWIS S, BAIN B, BATES L. 2008. Dacie y Lewis, hematología práctica, Editorial Elsevier, Madrid, España, pp. 223-225.

- MAYA G. 2007. Evaluación del paciente con trombocitopenia. *Med. Lab.* 13(9-10):411-435.
- MOLERO T, JOU J. 2002. Nuevas aplicaciones clínicas de la automatización del laboratorio de hematología. Disponible en línea en: <http://www.buenastareas.com/ensayos/Nuevas-Aplicaciones-C1%C3%ADnicas-De-La-Automatizaci%C3%B3n/3141997.html> (Acceso 22.10.2010).
- MOLERO T, LEMES C, DE LA IGLESIA S. 2010. Utilización de anticuerpos monoclonales en los equipos de hematimetría con sistemas óptico y fluorescencia. *Haematol.* 95(1):20-25.
- OLSEN L, KRISTENSEN A, HANSGSTRO MJ. 2004. Increased platelet aggregation response in Cavalier King Charles Spaniels with mitral valve prolapsed. *J. Vet. Intern. Med.* 15(3):209-216.
- OMS (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD). 2002. Pautas éticas internacionales para la investigación biomédica en seres humanos. Publicación del Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS) en colaboración con la Organización Mundial de la Salud, Ginebra. 25 pp.
- RASI V, LINTULA R. 1986. Platelet function in the myelodysplastic syndromes. *J. Haematol.* 36(45):71-73.
- RODAK B. 2004. Hematología. Fundamentos y aplicaciones clínicas, Editorial médica panamericana, Buenos Aires, Argentina, pp. 85-90.
- ROMERO H. 2009. Citometría hemática automatizada. *Rev. Elec. Med.* 4:1-4.
- SANDHAUS L, OSEI E, AGRAWAL N, DILLMAN C, 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. *Am. J. Clin. Pathol.* 118(2):235-241.
- SHATTIL S, CUNNINGHAM M, HOXIE J. 1987. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood.* 70(1):307-315.
- SOKAL R, ROHLF J. 1981. Biometría, principios y métodos estadísticos en la investigación biológica, Editorial H. Blume, Madrid, España, pp. 115-120.