



Evaluación del recuento de reticulocitos obtenido por el sistema Coulter GEN-S.

Luisa Elena Fernández ¹.

Alfredo Gallardo ².

Gloria García ³.

¹Hematología Cátedra de Hematología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, UCV mendifer@cantv.net

²Hematología Cátedra de Hematología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, UCV gallarda@ucv.ve

³Sección de Hematología, Servicio de Bioanálisis, Hospital Universitario de Caracas, Caracas, Venezuela.

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 01 de Julio del 2007 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

RESUMEN

El recuento de reticulocitos es la prueba más sencilla para evaluar la actividad eritropoyética y los autoanalizadores hematológicos contribuyen a mejorar el desempeño del laboratorio en la realización de los mismos. Se evaluó el sistema Coulter GEN-S para la precisión, el acarreo, la estabilidad de la muestra y se comparó con la metodología de referencia. El instrumento demostró una precisión menor a la declarada por el fabricante, un acarreo nulo y una estabilidad de la muestra de 24 horas cuando es almacenada a temperatura ambiente y a 4°C. La comparación con la metodología de referencia se efectuó mediante la obtención del coeficiente de correlación, según las recomendaciones del estándar H44-A de la NCCLS y mediante la

metodología descrita por Bland y Altman. El coeficiente de correlación obtenido fue del 0,77 para el recuento relativo y 0,62 para el absoluto, similar al encontrado en otros estudios. Las gráficas de Bland y Altman demostraron una buena concordancia para los recuentos relativos y absoluto de reticulocitos con una diferencia de medias de 0,03% y $2,61 \times 10^9/L$ respectivamente. Estos resultados permiten recomendar el uso del Coulter GEN-S para la obtención del recuento de reticulocitos de una manera fácil, exacta y reproducible, que puede ser beneficiosa para muchos laboratorios clínicos.

PALABRAS CLAVE: reticulocitos, Coulter GEN-S, evaluación, autoanalizadores hematológicos.

EVALUATION OF THE RETICULOCYTE COUNT BY THE COULTER GEN-S SYSTEM.

SUMMARY

The Coulter GEN-S system was evaluated for accuracy, carry over and sample stability, these were compared to reference standards, obtaining the correlation rate, according to the recommendations of the standard H44-A (NCCLS) and by the methodology of Bland and Altman. The instrument showed a smaller accuracy than the one declared by the manufacturer, null carry over and a sample stability of 24 hours when it is stored both at room temperature and at 4°C. The correlation rate was 0,77 for the relative count and 0,62 for the absolute count; the graphics of Bland and Altman showed a good concordance for the relative and absolute counts of reticulocyte with a means difference of 0,03% y $2,61 \times 10^9/L$ respectively. We recommend the use of the Coulter GEN-S for obtaining of reticulocyte count as it is a procedure that is easy, accurate and reproducible in hematological practice.

KEY WORDS: : reticulocyte, Coulter GEN-S, evaluation, hematological auto analyzers

EVALUACIÓN DEL RECUENTO DE RETICULOCITOS OBTENIDO POR EL SISTEMA COULTER GEN-S.

INTRODUCCIÓN

El recuento de reticulocitos ha sido por muchos años la prueba más sencilla de la cual dispone el laboratorio clínico para valorar la actividad eritropoyética. El continuo aumento en los trasplantes de médula ósea, como procedimiento de tratamiento de numerosas neoplasias y el uso extensivo de agentes citotóxicos (quimioterapia y radioterapia) en estos trastornos, han aumentado el uso del recuento de reticulocitos para valorar la capacidad de respuesta medular frente a estas estrategias terapéuticas (1,2).

El método manual, de mayor uso dentro del laboratorio clínico está basado en la observación microscópica de frotis realizados con coloraciones supravitales. Factores propios de toda técnica morfológica manual como lo son: el bajo número de células contadas, la distribución al azar de los reticulocitos dentro del frotis, los artefactos de coloración, la variación en la coloración de los reticulocitos debidas al tiempo, la discriminación visual de los reticulocitos más maduros con poco restos de ARN, y la fatiga al realizar el recuento, generan una alta variabilidad intra e inter observador, con coeficientes de variación para este análisis del 15 al 20% cuando los recuentos son elevados y de hasta el 40% cuando los recuentos se encuentran dentro del intervalo de referencia biológico, lo que se traduce en una alta imprecisión y por ende en resultados poco

confiables. (1-5). Sin embargo, cuando se aplican los lineamientos del protocolo H44-A de la NCCLS la metodología manual constituye la metodología de referencia (6).

La alta imprecisión de la metodología manual, sobre todo en recuentos bajos que definen la reducción de la actividad eritropoyética de la médula, o en situaciones en la cual, pequeñas pero significativas variaciones que suelen indicar recuperaciones tempranas de la post aplasia o post trasplante de médula ósea, han impulsado el diseño de metodologías más eficientes y confiables para realizar recuentos de reticulocitos (7). Es así, como se incorporan en los años de 1980, los instrumentos hematológicos para el recuento automatizado de reticulocitos, basado en coloraciones supravitales o por fluorescencia del ARN, para demostrar estructuras intrareticulocitarias; ofreciendo resultados más exactos y precisos y por ende más confiables (8-11).

El objetivo de esta investigación consistió en evaluar la precisión, el acarreo, la estabilidad de la muestra y la comparabilidad de los recuentos de reticulocitos realizado por el sistema Coulter GEN-S frente al método de referencia para los recuentos absolutos y relativos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó un instrumento Coulter GEN-S capaz de realizar todos los parámetros que conforman la hematología completa, así como también un diferencial leucocitario de cinco subpoblaciones y el recuento de reticulocitos. Para este último, el instrumento utiliza 0,200 mL del colorante nuevo azul de metileno (NAM) modificado, el cual es precalentado para añadirle 0,031 mL de muestra de sangre total y proceder a la incubación a 37°C, que produce una coloración de las estructuras intracelulares de los reticulocitos (ARN, ribosomas) que gracias al enfoque hidrodinámico y a la tecnología de medición VCS (volumen, conductividad y dispersión de luz láser) en conjunto con el software se logra una separación exacta y precisa de los reticulocitos, que permiten realizar una medición confiable (9). El instrumento empleado fue calibrado según las instrucciones del fabricante y controlado diariamente mediante el empleo de controles comerciales a tres niveles (bajo, normal y alto).

Las muestras de sangre total fueron recolectadas con K3-EDTA como anticoagulante a 245 individuos aparentemente sanos, donantes voluntarios del Banco de Sangre de Hospital Universitario de Caracas, con recuentos de reticulocitos dentro del intervalo de referencia; y a 57 pacientes con diversas afecciones hematológicas que incluían recuentos de reticulocitos altos y bajos. Todas las muestras fueron procesadas por duplicado antes de transcurridas las cuatro horas desde su obtención, excepto las empleadas para estimar la estabilidad de la muestra.

La precisión del recuento de reticulocitos relativo del Coulter GEN-S se estimó mediante procesamiento por duplicado de todas las muestras recolectadas, exceptuando aquellas que tuvieran un recuento superior a 15,0%; se calculó el coeficiente de variación, obteniéndose de esta manera la precisión intra-corrida para grupos de recuento entre 0,0% y 15,0%, con el fin de compararlos con los suministrados con el fabricante.

El acarreo del instrumento fue estimado mediante la fórmula $[(j1-j3)/(i1-j3)] \times 100$, procesando una muestra ($i1$) con un recuento elevado por triplicado ($i1, i2, i3$) seguido por el procesamiento por triplicado de una muestra ($j1$) con recuento bajo ($j1, j2, j3$). El estudio de la estabilidad de la muestra se realizó almacenando 10 muestras con recuentos normales a temperatura ambiente y 6 muestras a 4°C, tras un periodo de 24 horas. Los datos arrojados fueron comparados mediante prueba T a un nivel de significación del 0,05.

La comparación para los recuentos absolutos y relativos de reticulocitos se efectuó a través del procesamiento de todas las muestras aparentemente sanas (donantes del banco de sangre) y

todas las muestras obtenidas de pacientes con alteraciones hematológicas, para un total de 302 muestras, cada una procesada por duplicado, tanto para el instrumento Coulter GEN-S, como para la metodología de referencia. Se empleó la obtención del coeficiente de correlación entre las metodologías (6), y la obtención de gráficas de Bland y Altman, en la que se compara la media de los resultados con las diferencias obtenidas por las dos metodologías (12), para estimar la concordancia de los resultados.

El recuento de reticulocitos de referencia se realizó según los lineamientos del protocolo H44-A del NCCLS (6), mezclando volúmenes iguales de sangre con colorante supravital ?nuevo azul de metileno? (NAM), después de reposar por 10 minutos a 37°C se realizaron los frotis, los cuales fueron identificados según código establecido para tal fin. El recuento se realizó según la técnica de línea quebrada, por dos operadores entrenados y calificados. Cada operador hizo el recuento en 2000 glóbulos rojos, para un total de 4000 células contadas por el método manual de referencia. La concordancia entre los observadores fue corroborada mediante gráficos de envolturas (13). Para calcular los recuentos absolutos por esta metodología se utilizó el recuento de glóbulos rojos obtenido por el Coulter GEN-S.

RESULTADOS

La precisión obtenida resultó mejor a la declarada por el fabricante (Tabla 1).

Recuento de reticulocitos relativo (%)n		CV obtenido	CV Recomendado por el fabricante
0,0 a 0,49	13	4,4%	< 16,5%
0,5 a 1,49	195	0,6%	< 14,5%
1,5 a 4,0	81	0,7%	< 11,0%
4,01 a 15,0	12	0,8%	< 5,5%

Tabla 1. Precisión obtenida del Coulter GENS para el recuento de reticulocitos relativo y la declarada por el fabricante (n = 301)

Para estimar el acarreo se procesó una muestra con un recuento de reticulocitos de 5,18 x10⁹/L y de 1,98 x10⁹/L por triplicado de manera consecutiva, obteniéndose un acarreo del 0%. Los resultados demuestran que no hay diferencia estadísticamente significativa (p>0,05) entre los recuentos de reticulocitos almacenados a temperatura ambiente o a 4°C en 24 horas (datos no mostrados).

En la figura 1 se muestran la grafica de correlación de la metodología de referencia frente al Coulter GEN-S y en la figura 2 las graficas de Bland y Altman, para los recuentos absolutos y relativos.

Figura 1. Correlación entre los recuentos de reticulocitos realizados por el Coulter GENS y la metodología de referencia. (n = 301)

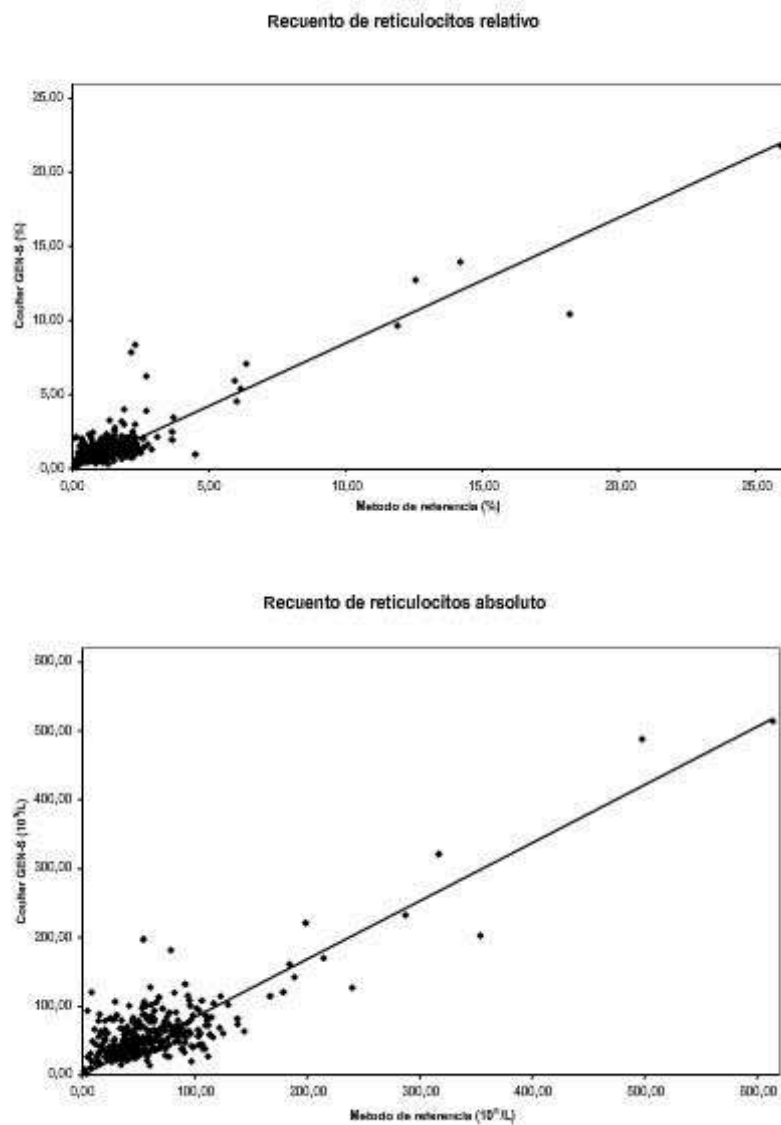
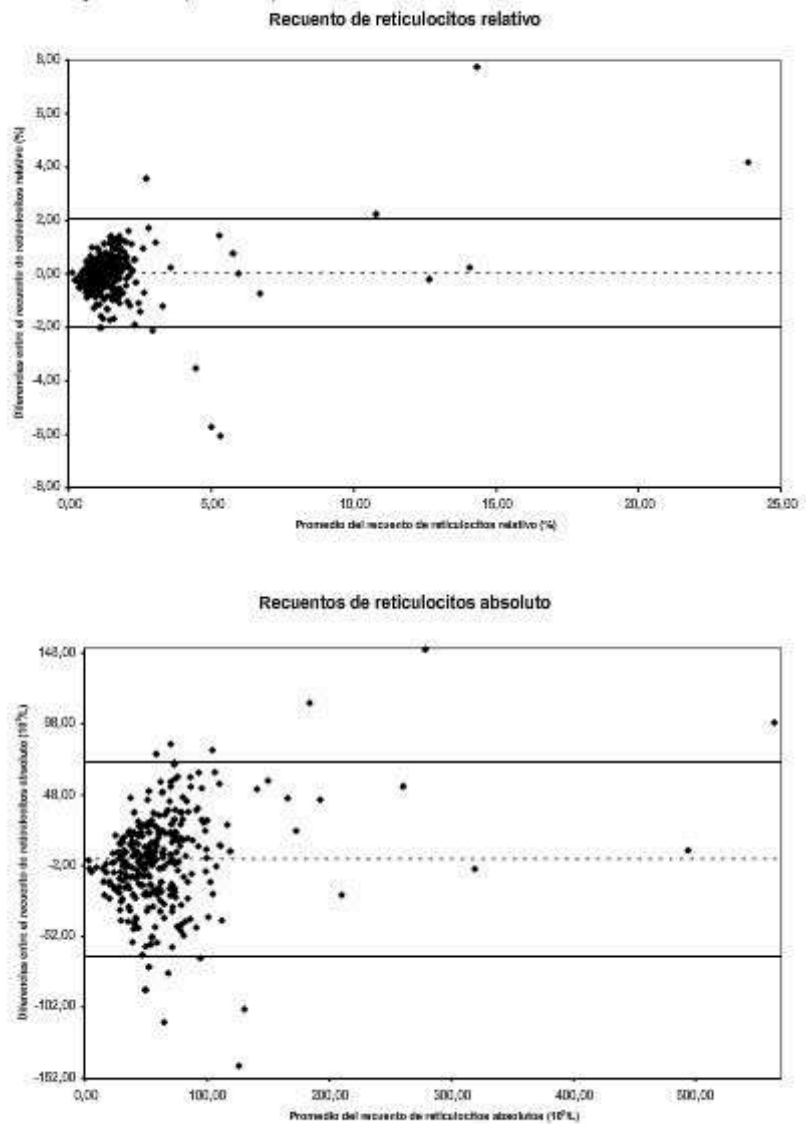


Figura 2. Comparación entre los recuentos de reticulocitos realizados por el Coulter GENS y la metodología de referencia, según los gráficos de Bland y Altman (n = 302).



La línea quebrada representa la diferencia de medias y las líneas continuas el intervalo de confianza del 95% para la diferencia de medias.

La tabla 2 resume los valores obtenidos de los estimadores de cada metodología para establecer la comparabilidad de las mediciones entre el Coulter GEN-S y la metodología de referencia.

Recuento de reticulocitos			
Descriptores	Parámetros	Relativo (%)	Absoluto (10 ⁹ /L)
De la muestra empleada	Media de referencia	1,62	66,59
	Media GENS	1,59	63,98
	Rango	0,09 a 27,76	1,62 a 613,72

Coeficiente de correlación	Ecuación de	$y = 0,8478 x$	$y = 0,8442 x$
	R^2	0,7741	0,6229
Metodología Bland y Altman	Diferencias de medias	de 0,03	2,61
	IC del 95%	-0,09 a 0,14	-1,23 a 6,43

Tabla 2. Estimadores de comparación entre Coulter GEN-S y la metodología de referencia (n = 302).

DISCUSIÓN

La metodología manual para el recuento de reticulocitos es la de mayor uso en los laboratorios clínicos, sin embargo, es una técnica que consume gran cantidad de tiempo y sus resultados suelen tener una alta variabilidad intra e inter observador, que genera una alta imprecisión y por ende resultados poco confiables (2).

La incorporación de metodologías automatizadas, permiten al laboratorio obtener recuentos de reticulocitos de forma más rápida, con una mayor precisión debida al mayor número de células contadas (más de 30.000) y también por que se eliminan gran parte de las fuentes de error que se generan en la técnica manual, sin embargo, deben de corroborarse las virtudes que ofrecen estas tecnologías antes de su incorporación a la rutina del laboratorio clínico.

La estabilidad de la muestra es satisfactoria al ser almacenada a temperatura ambiente o a 4°C, por 24 horas, similar a lo encontrado en otros estudios en los cuales incluso se reporta una estabilidad de hasta 48 horas a temperatura ambiente (7,10,14). Sin embargo, en la práctica diaria del laboratorio clínico debe evitarse este tipo de almacenamiento de muestra. El acarreo fue nulo, igual al descrito por otros autores (10) y la precisión es aceptable e incluso inferior a la declarada por el fabricante.

La obtención del coeficiente de correlación entre las metodologías constituye la técnica estadística clásica para establecer comparación entre metodologías y es la recomendada por la NCCLS para el recuento de reticulocitos. Los coeficientes de correlación obtenidos para los recuentos relativo y absoluto son una evidencia de buena correlación entre el Coulter GEN-S y la metodología de referencia, y resultan similares a los obtenidos en otros estudios similares (9, 15).

Una estrategia alternativa y de mayor confianza para establecer concordancia entre dos metodologías es la descrita por Bland y Altman (9, 12), la cual se basa en establecer graficas en las que se compara las diferencias obtenidas entre las metodologías a evaluar, se calcula la diferencia de las medias y se establecen limites de aceptación dado por las dos desviaciones estándar alrededor de la media de las diferencias. La media de las diferencias constituye una medida del sesgo de la medición realizada por el Coulter GEN-S al ser comparado con los recuentos obtenidos por la metodología de referencia. Las gráficas de Bland y Altman revelan

una buena concordancia entre ambas metodologías (Figura 2). Con una confianza del 95% este sesgo no es significativo y las mediciones realizadas por el Coulter GEN-S son comparables a las obtenidas con el método de referencia, tanto para los recuentos absolutos como para los relativos. Los sesgos obtenidos son de 0,03% para recuentos relativos y del $2,61 \times 10^6/L$ para los absolutos. Estos sesgos positivos han sido descritos por otros autores (9) y no son exclusivos de este instrumento (15), son atribuibles al sistema de medición automatizado que es mucho más sensible a la medición de estructuras intra reticulocitarias, que no pueden ser observables en el sistema óptico de medición manual que emplea la metodología de referencia. Desde el punto de vista clínico este pequeño sesgo positivo no debería causar mayor impacto en el nivel de decisión clínica.

Las evaluaciones de los instrumentos realizadas por terceros confirman las características de desempeño que declaran los fabricantes y constituyen un aval para la incorporación de estas tecnologías en los servicios de bioanálisis, y a éstos como una evaluación de la conformidad del instrumento, que actualmente es exigida por estándares de acreditación, tal como la norma COVENIN ISO 15:189 (16). El Coulter GENS resultó un instrumento confiable debido a que sus resultados son comparables a los arrojados cuando se realiza la metodología de referencia, razón por la cual se recomienda su incorporación a la rutina hematológica.

Agradecimientos: A Repreclin-Lab C.A. quien facilitó el autoanalizador Coulter Gen-S con todos los reactivos necesarios para la realización de este trabajo. Al Jefe del Laboratorio del Hospital Universitario de Caracas (HUC), Lic. Oscar Ivan Silva por prestarnos sus instalaciones y en especial a la Dra. Maribel Meléndez, Jefe del Banco de Sangre del HUC por su valiosa cooperación al facilitarnos la toma de muestras a los donantes.

REFERENCIAS

1. Corberand JX. Reticulocyte analysis using flow cytometry. *Hematol Cell Ther* 1996;38: 487-494.
2. Gutierrez G., Jou JM., Vives Corrons JL. Comité de Estandarización en Hematología. Evaluación Externa de la Calidad del Recuento Visual de Reticulocitos (RVR): Cuatro años de Experiencia. *Sangre* 1995;40(2):161-164.
3. Savage R., Skoog D., Rabinovitch A. Analytic Inaccuracy and Imprecision in reticulocyte Counting: A Preliminary Report from the College of American Pathologists Reticulocyte Project. *Blood Cells* 1985;11:97-112.
4. Schimenti K., Lacerna K., Wamble A. et al. Reticulocyte Quantification by Flow Cytometry, Image Analisis and Manual Counting. *Cytometry* 1992;13:853-862.
5. Peebles D., H(ASCP), Hochberg A. et al. Brief Scientific Reports. Analysis of Manual Reticulocyte Counting. *Am J Clin Pathol* 1981; 76: 713-717.
6. National Committee For Clinical Laboratory Standards: Methods for reticulocyte counting (flow cytometry and Supravital Dyes); Approved guideline. NCCLS document H44-A. Villanova, PA: NCCLS, 1997.

7. Buttarello M., Bulian P., De Prá M., et al. Reticulocyte quantification by Coulter Maxm VCS (volume, conductivity, light scatter) technology. *Clinical Chemistry*; 1996;42(12): 1930-1937.
8. Pierre RV. Reticulocytes. Their usefulness and measurement in peripheral blood. *Clinics in Laboratory Medicine* 2002;22(1):63-79.
9. Kessler C, Machin SJ, Pollard Y, Grant D, Sheridan B, Charles C, Kramer K, Pierre RV. Reticulocyte performance on the Coulter® GEN.Stm system. *Lab Hematol* 1997;3:41-47.
10. Van Den Bossche, J., Devreese, K., Malfait, R., Van De Vyvere M, De Schouwer P. Comparison of the reticulocyte mode of the Abx Pentra 120 Retic, Coulter® General-Stm, Sysmex® SE 9500, Abbott CD 4000 and Bayer Advia® 120 haematology analyzer in a simultaneous evaluation. *Clin Lab Haem* 2001;23:355-360.
11. Rudensky B. Comparison of a semi-automated new Coulter methylene blue method with fluorescence flow cytometry in reticulocyte counting. *Scand J Clin Lab Invest* 1997; 57: 291-296.
12. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*, 1986;i:307-310.
13. National Committee For Clinical Laboratory Standards: Reference leukocyte differential count (Proportional) and evaluation of instrumental Methods; Approved standart. NCCLS documnetn H20-A. Villanova, PA: NCCLS, 1992.
14. Peng L., Yang H., Jiang H., et al. Automated reticulocyte counting using the Sysmex RAM-1. *Clin Lab Haem* 2001; 23: 97-102.
15. Yu PH, So CC, Wong KF, Lee KC, Chow CS, Yip LK, Ho HK, Suen M. Automated reticulocyted counting ? an evaluation of GEN-S, Cell-Dyn 3500 and Cell-Dyn 4000. *Clin Lab haem* 1999;21:145-147.
16. COVENIN-ISO 15189:2004 (ISO 15189:2003) Laboratorios clínicos ? Requisitos particulares para la calidad y la competencia. FONDONORMA, Caracas; 2004.