



# Diseño e implementación de un programa para la evaluación externa de la calidad de la identificación en morfología hemática basado en frotis sanguíneos virtuales

Alfredo Gallardo Acevedo<sup>1</sup>.

Amadita López<sup>2</sup>.

Luisa Elena Fernández<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Lic. en Bioanálisis. Especialización en Análisis de datos en Ciencias Sociales. Profesor Asociado, Cátedra de Hematología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. alfredo.gallardo@ucv.ve

<sup>2</sup>Lic. en Bioanálisis Profesor Asociado (Jubilado), Cátedra de Hematología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

<sup>3</sup>Lic. en Bioanálisis Profesor Agregado (Jubilado), Cátedra de Hematología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

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

Consignado el 18 de Mayo del 2015 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

## RESUMEN

Los avances en hardware y software permiten la captura de imágenes con calidad similar a lo observable en un microscopio óptico. Nuestro objetivo fue simular un frotis sanguíneo de manera virtual (FSV), con la finalidad de crear un material de referencia para realizar un programa de evaluación externa de la calidad en morfología hemática. Se diseño un FSV conformado por una imagen representativa de varios campos de un frotis físico visto al microscopio con aumento de 400X, elaborado en formato Web, alojado en un servidor y accesible desde internet. Se diseñó y elaboró un sitio web para el funcionamiento del programa, así como dos FSV utilizados en la primera ronda en 2011. Participaron 50 bioanalistas y 10 estudiantes de Venezuela, cuyo desempeño fue en el 79% de los casos entre aceptable-excelente en ambos FSV, indicativo de buenos niveles de competencia. Recomendamos implementar el programa de manera continua e incluir variadas morfologías para mejorar la capacidad de reconocimiento hemático.

**PALABRAS CLAVE:** Microscopía virtual, frotis virtual, evaluación externa, morfología hemática, hematología

## DESIGN AND IMPLEMENTATION OF A PROGRAM FOR EXTERNAL EVALUATION OF THE QUALITY OF BLOOD MORPHOLOGICAL ANALYSIS USING VIRTUAL BLOOD SMEARS

## SUMMARY

Advances in hardware and software allow the capture of images with quality similar to what can be observed in an optical microscope. Our goal was to simulate a Virtual Blood Smear (VBS), in order to create an ideal material to be used in external quality assessment program in blood morphology. A VBS consists of a representative image of multiple fields of a physical smears seen under a microscope with 400X magnification, developed in Web format, hosted on a server and accessible from the Internet was designed. It was designed and developed a website for the operation of the program, as well as two VBS used in the first round in 2011. Participated 60 individuals from Venezuela, whose performance was in 79% of cases between acceptable-excellent in both VBS, indicative good levels of competence. We recommend implementing the program on an ongoing basis and include various morphologies to enhance the ability of blood cell recognition.

**KEY WORDS:** virtual microscopy, virtual smear, external evaluation, blood morphology, hematology

# DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE UN PROGRAMA PARA LA EVALUACIÓN EXTERNA DE LA CALIDAD DE LA IDENTIFICACIÓN EN MORFOLOGÍA HEMÁTICA BASADO EN FROTIS SANGUÍNEOS VIRTUALES

## INTRODUCCIÓN

Los avances en las ciencias de la computación y de la microscopía, tanto de hardware como de software permiten la captura de imágenes de calidad similar a la observable por un individuo en un microscopio óptico. Además la posibilidad de unir varias fotos, produce áreas fotográficas de gran formato que permiten la creación del frotis sanguíneo virtual<sup>(1,2)</sup>. El frotis virtual usualmente comprende un área del frotis sanguíneo digitalizado y un sistema que simula un microscopio, por medio del cual se puede recorrer el frotis, hacer anotaciones, disponer de un contador para el diferencial leucocitario e incluso cambiar de aumento, cuyo formato y arquitectura de almacenamiento son variados<sup>(1-11)</sup>.

El frotis virtual constituye una nueva forma de visualizar un frotis sanguíneo, en el computador personal, a lo que se le ha denominado microscopía virtual. La microscopía virtual es una corriente de innovación aún en fase primitiva, pero que se perfila como el futuro de la observación microscópica en educación, y posiblemente para realizar la observación de rutina de los frotis sanguíneos de pacientes que asisten a los laboratorios clínicos, actividad que se ha comenzado a realizar en laboratorios altamente automatizados<sup>(12)</sup>.

La validez del frotis virtual ha sido demostrada al encontrarse una alta concordancia entre lo observado en un frotis físico y uno virtual<sup>(2)</sup>, lo que lo convierte en una valiosa herramienta con fines docentes y para su uso en programas de evaluación externa de la calidad (PEEC), debido a que es un material absolutamente homogéneo, estable y bioseguro.

El objetivo de esta investigación consistió en diseñar y desarrollar un frotis sanguíneo virtual, a fin de emplearlo como un ítem de ensayo en un programa de evaluación externa de la calidad en morfología hemática, de carácter educativo para los profesionales del laboratorio clínico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño del frotis sanguíneo virtual

Se elaboraron frotis sanguíneos en láminas portaobjetos de una muestra obtenida de un paciente, por punción venosa en condiciones de asepsia, mediante un sistema de tubos al vacío con K2EDTA como anticoagulante (BD, USA), siguiendo los lineamientos bioéticos del protocolo de Helsinki. Los frotis fueron fijados con metanol y coloreados con tinción de Wright acuosa empleando el coloreador Aerospray (WESCOR, USA), siguiendo el procedimiento interno “elaboración de frotis sanguíneos” y los “criterios de calidad” establecidos<sup>(13,14)</sup>. Para la digitalización se utilizaron los frotis con la mejor calidad de distribución, coloración y campos apropiados.

Se seleccionó un área del frotis sanguíneo con una distribución homogénea de los elementos

formes y con un número de leucocitos mayor a 120, esta área fue digitalizada empleando un microscopio Olympus BX2 con cámara fotográfica digital DP25 (Olympus, Japón). Se tomaron de forma secuencial y sistemática fotografías de tamaño 1360 x 1024 píxeles (px), en formato PNG, de un tamaño aproximado de 2,5 Megabyte (MB). Se empleó un objetivo de 20X, para un aumento total de 200x. El área seleccionada, de aproximadamente 2 x 2 milímetros, se digitalizó inicialmente mediante un barrido horizontal (eje x) de la platina manual, tomando fotografías a una distancia entre sí de 0,3 mm, para luego mover la platina de forma vertical 0,2 mm (eje y) y realizar la captura de éste eje en forma horizontal. La secuencia de movimientos fue realizada hasta completar el área a digitalizar. El solapamiento de las fotos entre sí fue de aproximadamente el 40%.

Cada barrido horizontal del área digitalizada fue reconstruido uniendo las imágenes de la secuencia, luego se unieron las filas horizontales, hasta reconstruir de manera digital el área capturada. Fueron eliminados los excesos laterales (generados por un sesgo en el movimiento de la platina manual empleada) a fin de obtener un rectángulo. La imagen final fue almacenada en formato PNG.

El solapamiento de las imágenes generó en algunas zonas del frotis dos efectos indeseables, ausentes en el frotis físico: a) un fondo de frotis heterogéneo en cuanto al color, con cambios abruptos de tonalidad, que fue corregido unificando el color de fondo a una tonalidad clara, seleccionada de la misma foto; b) generación de “quimeras digitales”, formadas por uniones incompletas de glóbulos rojos que generaban elementos abstractos e irreales, y eran producto del solapamiento que se dio al unir las fotografías primero horizontalmente y luego verticalmente. Cada una de estas quimeras fue borrada de la imagen.

La imagen limpia del frotis digital fue dividida en porciones más pequeñas, a fin de facilitar su uso por parte de los navegadores de internet. Primero se dividió la imagen en porciones de 4.000 x 4.000 px y cada una de éstas se dividió en 16 imágenes de 1.000 x 1.000 px aproximadamente, guardadas en formato JPG de máxima calidad. Para el tratamiento de las imágenes se empleó el software Photoshop CS3 (Adobe, USA).

Para reconstruir el frotis digital fragmentado, se creó una tabla en formato html, donde cada una de las fotografías de 1.000 x 1.000 px ocupa una celda. El archivo fue llamado “fotos.html”. Las fotografías fueron almacenadas en una carpeta denominada “imagenes”. Para completar el frotis sanguíneo virtual, se diseñó y creó un archivo html que contiene la identificación del programa y del frotis, un enlace a una página de ayuda, otro para salir del frotis, y una imagen orientadora del frotis, que permite ir a cinco puntos dentro del frotis virtual (las cuatro esquinas y centro). Fue integrado un “contador” de glóbulos blancos, para realizar el diferencial leucocitario, desarrollado en el lenguaje JavaScrip<sup>(15,16)</sup>. Este archivo fue llamado “microscopio.html” y constituye el “microscopio virtual”. Los archivos fotos.html y microscopio.html fueron integrados en una sola página web, mediante la creación de marcos o frames<sup>(15)</sup> llamado “fvXX.html”, donde XX constituye el código que identifica al frotis. La estructura del marco está compuesta en un 90% de la pantalla por el frotis, mientras que el microscopio se ubica en la porción inferior de la pantalla, ocupando un 10% restante. En los diversos tamaños de pantalla y navegadores probados (Explorer, Firefox, Opera, Chrome, Safari) esta configuración fue satisfactoria.

## Diseño del programa de evaluación externa en morfología hemática virtual (PEEC MHV)

La intención del PEEC fue evaluar la competencia en morfología hemática de los profesionales del laboratorio clínico y constituye el resultado de la evolución de uno realizado previamente con frotis físicos<sup>(17)</sup>, basado en las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud<sup>(18)</sup>.

El programa está estructurado para desarrollarse por rondas, constituida por dos frotis sanguíneos, codificados como 1101FV01 y 1101FV02 (AARR-FVXX, donde AA representa el año, RR la ronda y XX el número del frotis). Se creó un sitio web amigable, sencillo y liviano, cuyo contenido describe el programa, contiene las instrucciones para su participación y alberga a los frotis virtuales. El sitio web [http://www.bioanalisisaldia.net/pueec\\_mhv/index.html](http://www.bioanalisisaldia.net/pueec_mhv/index.html) fue estructuralmente escrito en html y formateado mediante hojas de estilo en cascada<sup>(15,16)</sup>. Solo el envío del reporte fue escrito en lenguaje php, el cual por medio de la función mail se enviaba, vía correo electrónico los resultados al organizador ([pueec.mh@gmail.com](mailto:pueec.mh@gmail.com)) y una copia al participante<sup>(19)</sup>. A fin de dar una identidad propia al programa, se le denominó "Programa Universitario de Evaluación externa de la Calidad en Morfología Hemática Virtual" (PUEEC MHV).

La fecha de distribución establece el inicio de la observación del frotis sanguíneo virtual por parte del participante, la "fecha límite de envío de resultados" se estableció en tres semanas, y un plazo de 30 días para el análisis y envío del informe final a cada participante, por parte del organizador (fecha de entrega del informe final). Los participantes fueron profesionales del laboratorio clínico del área de hematología que emplearan el frotis sanguíneo dentro de sus procedimientos habituales, los participantes debían tener habilidades computacionales mínimas, un computador con acceso a internet y una cuenta de correo electrónico.

A fin de evaluar la competencia en morfología hemática, el participante observó la morfología hemática y realizó el diferencial leucocitario de un frotis sanguíneo virtual, del cual sólo podía reportar un máximo de cinco hallazgos de un listado de 70<sup>(20, 21)</sup>. Los hallazgos incluyeron anomalías morfológicas de la serie roja: tamaño, forma, color e inclusiones, distribución, presencia de elementos inmaduros; de la serie blanca: número, inclusiones, variantes de leucocitos y elementos inmaduros; plaquetas: número, tamaño, distribución y características celulares; y otros elementos que pueden ser evidenciados en un frotis de sangre periférica, tales como el Plasmodium. Aquellos términos que no definen u orientan de manera importante lo observado en el frotis, fueron excluidos de la lista (anisocitosis, poiquilocitosis). El diferencial leucocitario fue reportado de la forma usual (en porcentaje en base a cien elementos).

La asignación del valor de referencia de la morfología hemática y el diferencial leucocitario, fue dada por el consenso de un grupo de árbitros (profesionales del laboratorio clínico de reconocida competencia en la observación de frotis sanguíneos), que ingresaron al sitio web del PEEC previo al inicio de la ronda, donde analizaron los frotis virtuales y reportaron sus resultados según las instrucciones establecidas, los árbitros debían realizar el diferencial de todos los glóbulos blancos del frotis virtual.

Para la morfología hemática se definieron los cinco hallazgos (en caso de existir tal número) de la siguiente manera: a) considerados de consenso aquellos hallazgos con una concordancia entre los árbitros igual o mayor al 80% (22), b) hallazgos con menor concordancia fueron discutidos en reunión hasta lograr el consenso mediante: visualización del frotis virtual, revisando todos los reportes, opiniones, el diagnóstico presuntivo y hematología completa; para definir su pertinencia. El valor de referencia del diferencial leucocitario se estableció como el intervalo de confianza del 95% para el valor consenso obtenido, definido como la media aritmética de los árbitros para cada línea celular (redondeado al valor entero). Se verificó la exactitud del recuento obtenido mediante el empleo de gráficos de envolturas del 95% y 99% de confianza para un recuento determinado, siguiendo los lineamientos de protocolo NCCLS H20-A (14).

A cada participante se le asignó un código de identificación a fin de mantener la confidencialidad. Los resultados de la morfología hemática del participante fueron contrastados con el valor de referencia, por medio del cual se obtuvo su nivel de desempeño. Se establecieron tres niveles de desempeño (excelente, aceptable y pobre). Debido al carácter educativo del programa se incluyó una recomendación acorde con el nivel de desempeño obtenido, que pretendió guiar al participante a mejorar su competencia en morfología hemática. Para el diferencial leucocitario sólo se incluyó el intervalo de confianza al 95% para cada línea celular a fin de que el participante pueda realizar una autoevaluación de sus resultados, salvo en aquellos casos en los que se observaron resultados aberrantes que incluyó también una recomendación.

A cada participante se le envío por correo electrónico un informe de resultados de carácter confidencial que incluyó la siguiente información: total de participantes que respondieron el ítem de ensayo, los resultados para morfología hemática que incluyó los hallazgos morfológicos de referencia y los señalados por el participante, un gráfico con los hallazgos señalados por todos los participantes y los considerados de referencia, el desempeño obtenido para la morfología hemática, las recomendaciones a seguir para mejorar su competencia en morfología hemática, comentarios del Coordinador y resultados del diferencial leucocitario (resultados de referencia, media de los participantes, el intervalo de los participantes y los resultados individuales). Además se realizó un informe final global, que fue colocado en el sitio web del programa (sección resultados). La estadística descriptiva se realizó con el software Microsoft Excel® 2010.

## RESULTADOS

### Frotis virtuales

Fueron elaboraron dos frotis sanguíneos virtuales, codificados como 1101FV01 ([http://www.bioanalisisaldia.net/pueec\\_mhv/frotis/1101FV01/1101FV01.html](http://www.bioanalisisaldia.net/pueec_mhv/frotis/1101FV01/1101FV01.html)), obtenido de una muestra de un paciente con recuento de plaquetas superior a  $1.000 \times 10^9/L$  y alteraciones en la morfología de las plaquetas; y el 1101FV02 ([http://www.bioanalisisaldia.net/pueec\\_mhv/frotis/1101FV01/1101FV02.html](http://www.bioanalisisaldia.net/pueec_mhv/frotis/1101FV01/1101FV02.html)) proveniente de un paciente con drepanocitosis. La Tabla 1

recopila los detalles técnicos de la captura y procesamiento de la imagen. La figura 1 muestra algunas quimeras digitales y fondos heterogéneos que fueron eliminados.

Tabla 1. Características del procesamiento de la imagen de los frotis virtuales

| Frotis virtual                     | 1101FV01           | 1101FV02           |
|------------------------------------|--------------------|--------------------|
| Área seleccionada                  | 3,5 x 2,2 mm       | 3,0 x 2,4 mm       |
| Número de fotos tomadas            | 192                | 143                |
| Número de ejes horizontales        | 12                 | 13                 |
| Imagen reconstruida                |                    |                    |
| Tamaño                             | 14.837 x 7.630 px  | 10.240 x 7.976 px  |
| Formato PNG                        | 96,8 Mb            | 66,1 Mb            |
| Recortes iniciales:                |                    |                    |
| Número                             | 8                  | 6                  |
| Tamaño                             | 3.709 x 3815 px    | 3.413 x 3.988 px   |
| Formato                            | PNG                | PNG                |
| Peso                               | 26,0 Mb            | 13,2 Mb            |
| Recortes finales:                  |                    |                    |
| Número                             | 128                | 96                 |
| Tamaño                             | 927 x 954 px       | 853 x 997 px       |
| Formato                            | JPG máxima calidad | JPG máxima calidad |
| Peso                               | 222 kb (0,22 Mb)   | 179 Kb (0,17 Mb)   |
| Peso final del frotis digitalizado | 26,3 Mb            | 14,4 Mb            |

### Quimeras digitales



### Fondos heterogéneos



Figura 1. Algunas quimeras digitales y fondos heterogéneos encontrados y eliminados.

### PEEC MHV

El valor de consenso de la morfología hemática y el diferencial leucocitario se muestra en la Tabla 2. La exactitud en el diferencial leucocitario de consenso, fue verificada por medio de las gráficas de envoltura para cada línea celular, para el 95% y 99% de confianza (14), que resultaron satisfactorias (datos no mostrados).

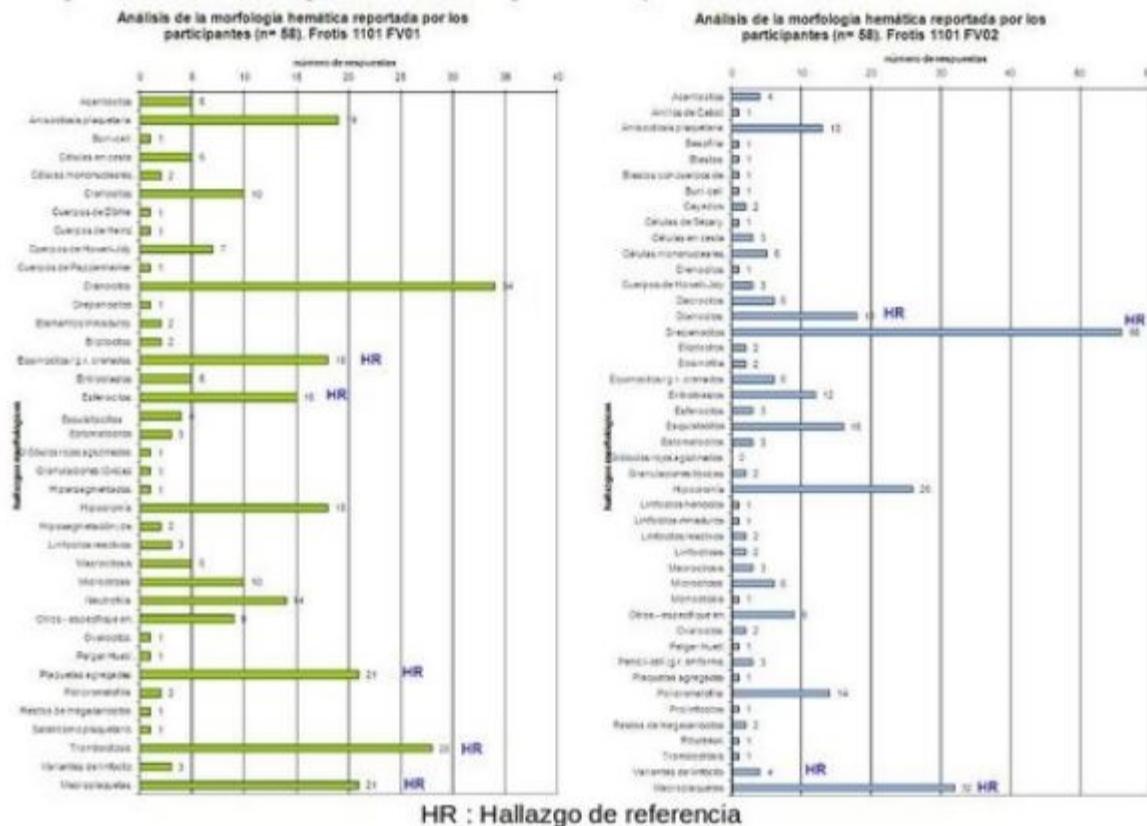
**Tabla 2. Valor de referencia (consenso) de la morfología hemática y diferencial leucocitario de la ronda 1101.**

|                                   | 1101 FV01 |                          |      | 1101 FV02      |      |      |
|-----------------------------------|-----------|--------------------------|------|----------------|------|------|
|                                   | Consenso  | Li                       | Ls   | Consenso       | Li   | Ls   |
| # células contadas                | 949       |                          |      | 667            |      |      |
| % Basófilos                       | 0,0       | 0,0                      | 0,0  | 0,0            | 0,0  | 0,0  |
| % Eosinófilos                     | 0,6       | 0,0                      | 2,0  | 3,4            | 1,0  | 5,0  |
| % Blastos                         | 0,2       | 0,0                      | 0,0  | 0,2            | 0,0  | 0,0  |
| % Promielocitos                   | 0,0       | 0,0                      | 0,0  | 0,0            | 0,0  | 0,0  |
| % Mielocitos                      | 0,0       | 0,0                      | 0,0  | 0,0            | 0,0  | 0,0  |
| % Metamielocitos                  | 0,6       | 0,0                      | 2,0  | 0,0            | 0,0  | 0,0  |
| % Cayados                         | 2,2       | 0,0                      | 4,0  | 1,7            | 0,0  | 4,0  |
| % Neutrófilos                     | 76,3      | 70,0                     | 82,0 | 44,6           | 38,0 | 52,0 |
| % Monocitos                       | 3,9       | 1,0                      | 7,0  | 2,6            | 1,0  | 5,0  |
| % Linfocitos                      | 16,2      | 11,0                     | 21,0 | 47,5           | 40,0 | 54,0 |
| Otros                             | 0,0       | 0,0                      | 0,0  | 0,0            | 0,0  | 0,0  |
| Eritroblastos/100 GB              | 1,0       | 0,0                      | 2,0  | 0,6            | 0,0  | 2,0  |
| Hallazgos morfológicos observados | 1         | Trombocitosis            |      | Drepanocitos   |      |      |
|                                   | 2         | Plaquetas agregadas      |      | Trombocitosis  |      |      |
|                                   | 3         | Plaquetas grandes        |      | Macroplaquetas |      |      |
|                                   | 4         | Esferocitos              |      | Dianocitos     |      |      |
|                                   | 5         | Equinocitos/ gr crenados |      | -----          |      |      |

Li: límite inferior. Ls: límite superior

Se realizó una convocatoria a los laboratorios participantes registrados en las ediciones anteriores del PEEC MH con frotis físicos, así como a todo aquel bioanalista que quisiera participar. La participación real, es decir de aquellos que realizaron y enviaron correctamente el reporte fue de 60 individuos, 50 bioanalistas y 10 estudiantes de Bioanálisis. Todos los participantes fueron de Venezuela, principalmente de la Gran Caracas (60.0 %) (Caracas, Altos Mirandinos, Eje Guatire- Guarenas), y de diversos sitios del interior del país (datos no mostrados). Un total de 59 participantes reportaron la morfología hemática y 58 reportaron el diferencial leucocitario para ambos frotis, contando un total de 5.879 leucocitos en el frotis 1101FV01 y 5.771 leucocitos en el frotis 1101FV02.

Un participante identificado como P60, no reportó el diferencial en 1101FV01, pero si la morfología y no reportó 1101FV02. Otro participante (P58) no reportó 1101FV01 argumentando una mala calidad del frotis, y otro participante (P23) dejó de reportar la morfología de 1101FV02. Algunos de los participantes contaron un número de células distinto a 100 (13 participantes en ambos frotis), razón por la cual el número de leucocitos contados no fue un múltiplo de 100. Los hallazgos morfológicos reportados por todos los participantes para ambos frotis, así como los hallazgos de referencia son mostrados en la Figura 2. Estas figuras le fueron suministradas a cada participante en su informe final.



**Figura 2.** Hallazgos morfológicos reportados en el frotis virtual.

El nivel de desempeño obtenido en morfología hemática por parte de los participantes se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Desempeño de los participantes para los ítems  
1101FV01 y 1101FV02

| Desempeño | ítem de ensayo |    |          |    |      |
|-----------|----------------|----|----------|----|------|
|           | 1101FV01       |    | 1101FV02 |    |      |
|           | n              | %  | n        | %  |      |
| Desempeño | Pobre          | 9  | 15,3     | 2  | 3,4  |
|           | Aceptable      | 37 | 62,7     | 50 | 84,7 |
|           | Excelente      | 13 | 22,0     | 7  | 11,9 |

Dos participantes reportaron la morfología de solo un ítem de ensayo, siendo aceptable su desempeño, y solo un participante obtuvo un desempeño excelente en los dos frotis virtuales. Los resultados del diferencial leucocitario se compilán en la Tabla 4.

**Tabla 4. Resultados del diferencial leucocitario**

|                                | 1101FV01   |               |         |      | 1102FV02   |               |         |      |      |      |
|--------------------------------|------------|---------------|---------|------|------------|---------------|---------|------|------|------|
|                                | Referencia | Participantes |         |      | Referencia | Participantes |         |      |      |      |
| Número de observadores         | 5          | 58            |         |      | 5          | 58            |         |      |      |      |
| Diferencial leucocitario       |            | M             | Limites |      |            | M             | Limites |      |      |      |
| % Basófilos                    | 0,0        | 0,0           | 0,2     | 0,0  | 8,0        | 0,0           | 0,0     | 0,2  | 0,0  | 4,0  |
| % Eosinófilos                  | 0,0        | 2,0           | 1,2     | 0,0  | 13,0       | 0,0           | 2,0     | 3,3  | 0,0  | 10,0 |
| % Blastos                      | 0,0        | 0,0           | 0,5     | 0,0  | 17,0       | 0,0           | 0,0     | 0,5  | 0,0  | 10,0 |
| % Promielocitos                | 0,0        | 0,0           | 0,1     | 0,0  | 3,0        | 0,0           | 0,0     | 0,0  | 0,0  | 1,0  |
| % Mielocitos                   | 0,0        | 0,0           | 0,1     | 0,0  | 2,0        | 0,0           | 0,0     | 0,2  | 0,0  | 5,0  |
| % Metamielocitos               | 0,0        | 2,0           | 0,4     | 0,0  | 4,0        | 0,0           | 2,0     | 0,3  | 0,0  | 4,0  |
| % Cayados                      | 0,0        | 4,0           | 1,1     | 0,0  | 15,0       | 0,0           | 4,0     | 0,9  | 0,0  | 11,0 |
| % Neutrófilos                  | 70,0       | 82,0          | 74,4    | 57,0 | 86,0       | 70,0          | 82,0    | 44,7 | 31,0 | 76,0 |
| % Monocitos                    | 1,0        | 7,0           | 5,2     | 0,0  | 11,0       | 1,0           | 7,0     | 4,8  | 0,0  | 49,0 |
| % Linfocitos                   | 11,0       | 21,0          | 16,5    | 5,0  | 24,0       | 11,0          | 21,0    | 44,2 | 0,0  | 56,0 |
| % Otros glóbulos blancos:      | 0,0        | 0,0           | 0,0     | 0,0  | 0,0        | 0,0           | 0,0     | 0,0  | 0,0  | 2,0  |
| Número de Eritroblastos/100 GB | 0,0        | 2,0           | 0,4     | 0,0  | 3,0        | 0,0           | 2,0     | 1,2  | 0,0  | 11,0 |

M: media

## DISCUSIÓN

Contar con un microscopio equipado con cámara digital, constituye el pilar fundamental para la captura de imágenes de campos microscópicos. Utilizando cámaras digitales con una resolución superior a los 3 mega pixeles (MP) se obtienen fotos de una adecuada calidad, y con resoluciones mayores de 6 MP se obtienen fotos indistinguibles de una foto convencional (23). Para la digitalización se contó con una cámara de 12 MP de resolución, que permitió obtener fotografías de excelente calidad. Sin embargo esto es un inconveniente debido al tamaño del archivo de las fotografías. Para minimizar este contratiempo, se digitalizó solo una pequeña área del frotis físico, lo cual puede generar algunos inconvenientes, como el sesgo de los campos escogidos en el momento de la digitalización, el cual se corrige al capturar una alta cantidad de campos microscópicos (2), tal y como fue realizado. Además se digitalizó un área mínima de 1,5 mm x 1,5 mm y se verificó que contuviera más de 100 leucocitos. Si bien el área es fija y relativamente pequeña, se tomó la previsión de que fuera un área representativa del frotis físico. Justamente una de las fortalezas del frotis virtual a la hora de establecer un PEEC, deriva del procedimiento para obtener la imagen del frotis físico, en el que se obtiene una imagen única que permite que todos los observadores visualicen imágenes idénticas, asegurando así un ítem de ensayo absolutamente homogéneo (2).

El frotis virtual también tiene la bondad de ser una preparación estable e inalterable, ya que la imagen digital perdura en el tiempo (aunque existe una pequeña pérdida de la calidad en el formato jpg empleado) y no puede ser alterada una vez que forma parte del frotis virtual. Así

mismo es una preparación totalmente biosegura, a diferencia del tradicional frotis físico cuyo soporte es una lámina de vidrio con una película de sangre. Las propiedades ideales de un ítem de ensayo para PEEC, se cumplen en el frotis virtual, ya que es homogéneo, estable y bioseguro (18).

Para el diseño del frotis sanguíneo virtual, se adoptó un formato web accesible desde internet, basado en tecnologías libres (html, javascript y php), aunque para su desarrollo se empleó software propietario, lo cual facilitó su elaboración. La obtención del frotis virtual fue realizada en varias etapas, en las que se fue estructurando su arquitectura y condiciones de la fotografía hasta lograr una versión definitiva. La meta fue obtener fotografías que reflejaran la observación de un frotis con el aumento usual de 400X (ocular 10X y objetivo 40X), un sistema que permitiera recorrer el frotis y disponer de un contador para el diferencial leucocitario. Una vez halladas las condiciones estipuladas, se procedió a obtener dos frotis virtuales obtenidos de dos frotis físicos distintos que fueron parte de la primera ronda del PEEC.

Una de las principales limitantes de los desarrollos web, cuyo acceso requiere ser hecho por internet, es el tamaño final de la aplicación. En el caso del frotis virtual el tamaño de las imágenes que lo conforman constituyó el principal reto. Frotis virtuales de 10 gigabyte (GB) o más, como los realizado por Linder E y cols en el área de parasitología, requieren una conexión banda ancha de varios MB para su eficiente acceso (9). Debido a que la actual banda ancha en Venezuela suele ser menor a 2 MB (de 256 kbps a 10 MB), la meta fue producir un frotis virtual que combinara el menor peso y la mejor calidad de imagen posible. La meta se cumplió debido a que se digitalizó un área pequeña de interés del frotis, se empleó un formato JPG de máxima calidad y se dividió la imagen en varios segmentos, lo cual facilita su descarga, en las lentas conexiones disponibles en la mayor parte de los hogares y sitios de trabajo. El tamaño final de los frotis 1101FV01 fue de 26.0 MB y el del 1101FV02 de 16.5 MB, los cuales fueron adecuados a la velocidades de conexión. Esto fue sustentado por el hecho que ningún participante del PEEC manifestó alguna crítica por el tiempo empleado para la descarga del frotis.

Aunque existen diversos diseños de PEEC en morfología hemática, la “selección de los hallazgos de mayor relevancia” presentes en el frotis, pretende recoger el “espíritu” de lo observado, a lo que se le ha denominado “morfología hemática” (24-26). Sin embargo para evitar cambios en el paradigma del uso del frotis, los participantes pueden realizar el diferencial leucocitario y el organizador proporcionó un valor de referencia establecido por el consenso de cinco árbitros, en aras de permitir la autoevaluación y detectar desempeños muy deficientes.

La evaluación del diferencial leucocitario es un punto de discordia, debido al bajo número de células contadas (usualmente cien) y la distribución de los elementos (en particular los de bajo recuento), que genera una elevada imprecisión, dificultando la detección de desempeños pobres (27, 28). Es por ello que estadísticamente se considera inexacto evaluar el desempeño, sobre todo cuando los recuentos son bajos, ya que es difícil detectar un mal desempeño, pero en contra parte permite detectar problemas graves de identificación de leucocitos, razón por la cual muchos programas evalúan el diferencial leucocitario (29). Con el fin de mantener la manera tradicional de ejecutar del frotis sanguíneo, se incluyó un valor de referencia del

diferencial leucocitario basado en el método de Rümke (26), tomando el valor de consenso de los árbitros (media redondeada al valor entero) y obteniendo el intervalo de confianza al 90% para cada línea celular, pero sin establecer un nivel de desempeño.

Para la obtención del valor de referencia cinco árbitros visualizaron el frotis en su computador personal realizando el diferencial a la cantidad total de leucocitos presentes en la imagen. Cada uno contó una cantidad total distinta de leucocitos y su diferencial también fue diferente. Un análisis de la imagen completa reveló que en el FV01 existen un total de 191 células, 11 restos celulares y 2 células no identificables, y en el FV02: 139 células, 10 restos celulares, 2 artefactos y 3 eritroblastos. Al comparar estos con los reportados por cada árbitro se evidencia que el total de leucocitos difiere entre 180 a 189 en el FV01 y de 110 a 148 en el FV02, lo cual es explicado por el sitio donde inician el recorrido del frotis, la forma de recorrerlo: de parte superior del monitor a la inferior o viceversa (desplazamiento vertical), de izquierda a derecha o viceversa (desplazamiento horizontal); así como la velocidad a la cual mueven la imagen. Un factor que también puede influir es que al realizar el movimiento ya sea vertical u horizontal, en algunas ocasiones se puede desplazar excesivamente la imagen, perdiendo la oportunidad de contar algunos elementos. Estos inconvenientes también se presentan al observar un frotis físico y lo tuvieron los participantes, pero con efectos mayores, debido a que solo contaron cien leucocitos, pero que forma parte de la realidad en la observación de un frotis físico.

La primera ronda del PEEC en morfología hemática virtual fue realizada entre marzo y abril del 2011, en la que participaron 60 individuos (50 licenciados en bioanálisis y 10 estudiantes de bioanálisis) de diversas partes de nuestro país. El desempeño obtenido en general para ambos frotis fue bueno, con desempeños aceptable-excelente del 87,7% y 96,6% para los frotis 1101FV01 y 1101FV02. De manera combinada el 79% de los participantes obtuvo un desempeño aceptable-excelente en ambos frotis (Tabla 5), lo que indica buenos niveles de competencia en morfología hemática.

**Tabla 5. Cruce de los desempeños de los participantes para ambos frotis.**

| <b>Desempeño 1101FV01 – 1101FV02</b> | <b>n</b> | <b>%</b> |
|--------------------------------------|----------|----------|
| Excelente - Excelente                | 1        | 1,7      |
| Excelente - Aceptable                | 18       | 30,0     |
| Aceptable - Aceptable                | 28       | 46,7     |
| Excelente - Pobre                    | 0        | 0,0      |
| Aceptable - Pobre                    | 11       | 18,3     |
| Pobre - Pobre                        | 0        | 0,0      |
| Excelente                            | 0        | 0,0      |
| Aceptable                            | 2        | 3,3      |
| Pobre                                | 0        | 0,0      |

Dos participantes sólo reportaron un ítem de ensayo y su desempeño fue aceptable

Parte del enfoque educativo del programa, incluyó una recomendación genérica según el desempeño obtenido, pero además una recomendación particular según el caso, en el

informe final enviado por correo electrónico a cada participante. Se aprovechó la tecnología digital y se le incluyeron imágenes de los hallazgos de referencia, capturados del frotis virtual. Así mismo se realizó un enlace del hallazgo morfológico de referencia al sitio dentro del frotis virtual en donde se encontraba el hallazgo morfológico, con el fin de reforzar el hallazgo, corregir los desempeños pobres y mejorar los desempeños aceptables. La posibilidad de capturar la imagen del hallazgo, así como enlazar el mismo en el propio frotis virtual, constituye una bondad del frotis sanguíneo virtual, y una ventaja en comparación con el frotis físico.

En el formato de reporte se incluyeron dos preguntas a fin de consultar a los participantes su opinión sobre el programa, la cual fue mayoritariamente satisfactoria. Muchos de los participantes dejaron un comentario positivo y alentador sobre el programa. Unos pocos participantes manifestaron algunos inconvenientes en el envío del reporte de resultado.

La potencialidad del frotis sanguíneo virtual y el PEEC diseñados, al encontrarse en un servidor web, permite el acceso desde internet a cualquier persona, democratizando el PEEC, porque cualquier profesional con acceso a internet y habilidades computacionales mínimas, puede ingresar al programa, visualizar los frotis virtuales y participar, incluso profesionales de otros países pueden hacer uso de esta dinámica, pudiendo llegar a una mayor cantidad de potenciales participantes, siendo su número virtualmente ilimitado, aunque para ello deberíamos mejorar algunos aspectos en la recepción de resultados y elaboración del informe final a fin de automatizar la captura y elaboración del mismo mediante algunos scripts en php. Esto resulta inalcanzable para el PEEC basado en frotis físicos, debido a que el material preparado es limitado, genera gastos importantes para el envío del ítem de ensayo, riesgo de ruptura de la lámina de vidrio, y una mayor logística previa para registrar a los participantes

Aunque la realización de un frotis virtual requiere de un gran esfuerzo y tiempo para su realización, el frotis sanguíneo virtual constituye una herramienta con un alto potencial en el área de la evaluación externa, debido a que se dispone de una imagen única, homogénea, inalterable, accesible a personas de diferentes lugares y de manera simultánea por medio de la internet, y que permite ubicar los hallazgos morfológicos en el propio frotis virtual, siendo así un ítem de ensayo ideal para este tipo de dinámicas de evaluación externa. Se recomienda la implementación del programa de manera continua, así como incluir frotis sanguíneos virtuales de variadas morfologías hemáticas a fin de mejorar la capacidad de reconocimiento hemático.

Las bondades del frotis virtual, abren la posibilidad de uso en otras áreas, tal como la docencia a nivel de pregrado, postgrado o cursos de actualización y capacitación, no solo en la modalidad presencial, sino también en las modalidades a distancia vía internet, siendo una herramienta con un amplio potencial de uso en un futuro inmediato.

**Agradecimientos:** Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela, cuyos aportes hicieron posible esta investigación, (ProyectoCHCH PG-09-7386-2008).

A los profesores: T. Delgado, M.L. Freitas, E. Olivo y A. Torres y a los bioanalistas participantes, por su valiosa colaboración durante el desarrollo de la investigación

## REFERENCIAS

- 1.- Hutchinson CV, Brereton ML, Burthem J. Digital imaging of haematological morphology. *Clin Lab Haematol.* 2005 Dec;27(6):357-62.
- 2.- Burthem J, Brereton M, Ardern J, Hickman L, Seal L, Serrant A, Hutchinson CV, Wells E, McTaggart P, De la Salle B, Parker-Williams J, Hyde K. The use of digital 'virtual slides' in the quality assessment of haematological morphology: results of a pilot exercise involving UK NEQAS(H) participants. *Br J Haematol.* 2005 Jul;130(2):293-6.
- 3.- Giansanti D, Grigioni M, D'Avenio G, Morelli S, Maccioni G, Bondi A, Giovagnoli MR. Virtual microscopy and digital cytology: state of the art. *Ann Ist Super Sanita.* 2010;46C23:BJ23 (2):115-22.
- 4.- Lee SH. Virtual microscopy: applications to hematology. *Lab Hematol.* 2005;11(1):38-45.
- 5.- Lien CY, Teng HC, Chen DJ, Chu WC, Hsiao CH. A web-based solution for viewing large-sized microscopic images. *J Digit Imaging.* 2009 Jun;22(3):275-85.
- 6.- Lundin M, Lundin J, Isola J. Virtual microscopy. *J Clin Pathol* 2004a;57:1250-1251.
- 7.- Lundin M, Lundin J, Helin H, Isola J. A digital atlas of breast histopathology: an application of web based virtual microscopy. *J Clin Pathol* 2004b;57:1288-1291.
- 8.- Fontelo P, DiNino E, Johansen K, Khan A, Ackerman M. Virtual microscopy: potential applications in medical education and telemedicine in countries with developing economies. *Proc. of the 38th Hawaii International Conference on System Sciences.* 2005:1-5.
- 9.- Linder E, Lundin M, Thors C, Lebbad M, Winiecka-Krusnell J, Helin H, Leiva B, Isola J, Lundin J. Web-based virtual microscopy for parasitology: a novel tool for education and quality assurance. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2(10):e315.
- 10.- Lundin M, Szymas J, Linder E, Beck H, de Wilde P, van Krieken H, García Rojo M, Moreno I, Ariza A, Tuzlali S, Dervişoğlu S, Helin H, Lehto VP, Lundin J. A European network for virtual microscopy--design, implementation and evaluation of performance. *Virchows Arch.* 2009 Apr;454(4):421-9.
- 11.- Brereton ML, DE LA Salle B, Burthem J, Ardern J, Hickman L, Seal L, McTaggart P, West M, Swirsky D, Parker-Williams J, Hyde K. Review of the UK NEQAS (H) digital morphology pilot scheme for continuing professional development accessed via the internet. *Int J Lab Hematol.* 2008 Oct;30(5):365-71.
- 12.- Briggs C, Longair I, Slavik M, Thwaite K, Mills R, Thavaraja V, Foster A, Romanin D, Machin SJ. Can automated blood film analysis replace the manual differential? An evaluation of the CellVision DM96 automated image analysis system. *Int. Jnl. Lab. Hem.* 2009, 31, 48-60
- 13.- Houwen B. Blood film preparation and staining procedures. *Lab hematol* 2000;6:1-7.

- 14.- NCCLS. Reference leucocyte differential count (proportional) and evaluation of instrument methods. NCCLS approved standard document H20-A. Villanova, PA; 1992.
- 15.- Niederst Robbins J. Diseño web: guía de referencia. Ed 1. Anaya Multimedia / O'Reilly. 2007
- 16.- Moseley R. Desarrollo de aplicaciones Web. 1 ed. Anaya Multimedia-Anaya Interactiva. 2007.
- 17.- Gallardo Acevedo A, López A. Programa de Evaluación Externa de la Calidad en Morfología Hemática. Diseño y experiencia en laboratorios clínicos Venezolanos. VITAE Academia Biomédica Digital, Número 32, Julio-Septiembre, 2007
- 18.- Deom A, El Aouad R, Heuck CC, Kumari S, Lewis SM, Uldall A, Wardle J. Requirements and guidance for external quality assessment schemes for health laboratories. World Health Organization, Geneva; 1999.
- 19.- Gil Rubio J. Creación de sitios Web con php 5. 1 ed. McGraw-Hill - España. 2008
- 20.- Beutler E, Lichtman M, Coller B, Kipps T, Seligsohn U, editors. Williams Hematology. Sixth Edition. International Edition. New York: McGraw-Hill; 2001.
- 21.- Cátedra de Hematología, Escuela de Bioanálisis, Universidad Central de Venezuela. Guía Práctica de Hematología I. Caracas, 2000.
- 22.- Rajamaki A. External quality control in haematological morphology: a method to assess the performance of an individual laboratory and changes in it. Scand J Clin Lab Invest. 1980 Feb;40(1):79-84.
- 23.- Riley RS, Ben-Ezra JM, Massey D, Cousar J. The virtual blood film. Clin Lab Med. 2002 Mar;22(1):317-45.
- 24.- Lewis SM. Quality assurance programmes in the United Kingdom. Ann Ist Super Sanita. 1995;31(1):53-9.
- 25.- Vives-Corrons JL, Gutierrez G, Jou JM, Reverter JC, Martinez-Brotóns F, Domingo A, Iriarte JA. Characteristics and performance of the external quality assessment scheme (EQAS) for haematology in Spain. Ten years of experience. Ann Ist Super Sanita. 1995;31(1):95-101.
- 26.- EQALM, Hematology Working Group of the European External Committee for External Quality Assurance Programmes in Laboratory Medicine. Vives Corrons JL, Van Blerk M, Albarède S, Gutierrez G, Heller S, Nordin G, Skitek M, Deom A, Horváth K, De la Salle B, Libeer JC. Guidelines for setting up an external quality assessment scheme for blood smear interpretation. Part II: survey preparation, statistical evaluation and reporting. Clin Chem Lab Med. 2006;44(8):1039-43.
- 27.- Dutsher T. Leukocyte differentials. Are they worth the effort?. Clinics in Laboratory Medicine 1984;4(1):71-87.
- 28.- Bentley SA. Quality control and the differential leukocyte count. Clin Lab Haematol

1990;12:1,101-109.

29.- Lewis SM. Blood film evaluations as a quality control activity. Clin Lab Haemat 1990;12(1):119-127.