

Validación del método analítico del citómetro XE-2100

y comparación con el método convencional para el conteo de leucocitos en líquidos corporales

Palabras clave: Citómetro XE-2100, conteo de leucocitos, líquidos corporales, método convencional o manual, muestras de diálisis peritoneal.

Key words: Cytometer XE-2100, leukocyte counting, body fluid, conventional or manual method, samples from peritoneal dialysis.

Recibido: 25/11/2009
Aceptado: 02/12/2009

Jonnathan Guadalupe Santillán Benítez,* Cynthia Nayeli Núñez Delira,* Enrique Morales Ávila,* Edelmira Mejía García*

* Laboratorio Clínico Centro Médico ISSEMyM

Correspondencia:

Jonnathan Guadalupe Santillán Benítez
E-mail: jonnathangsb@yahoo.com.mx
Tel: 0172-2275-6300 ext. 2134

278

Resumen

Antecedentes: El análisis del conteo celular en líquidos corporales tradicionalmente se lleva a cabo de manera manual, utilizando el método convencional o manual, involucrando una serie de pasos que contribuyen a la imprecisión y consumo excesivo de tiempo. El XE-2100 es un analizador con el principio de citometría de flujo fluorescente, el cual contiene un programa diseñado para el conteo de células en líquidos corporales. **Objetivo:** Determinar la precisión del XE-2100 con muestras clínicas y evaluar la concordancia y correlación para el conteo de leucocitos entre el analizador y el método convencional (manual). **Metodología:** Precisión: se utilizaron 6 muestras clínicas de líquido de diálisis peritoneal, de las cuales se realizaron 10 repeticiones de cada uno por los métodos mencionados, como cualquier muestra de líquido corporal. Concordancia y correlación: Se analizaron 42 muestras de líquidos corporales frescos a los cuales se les realizó el examen citológico. El conteo de leucocitos se llevó a cabo por el método convencional y con el equipo XE-2100. La prueba estadística empleada fue la de correlación de Pearson. **Resultados:** Precisión. Se observó un coeficiente de variación, el cual fue de 8.76%, menor al reportado por el fabricante, que reporta sea < 30%. Correlación. El coeficiente de correlación para el conteo de leucocitos entre el equipo XE-2100 y el

Abstract

Background: The analysis of cell counting in body fluids has been traditionally performed in a manual way, using the conventional or manual method. This process involves a series of steps that contribute to imprecision and excessive waste of time. XE-2100 is an analyzer that works through the principle of fluorescence flow cytometry, which presents a program designed for cell counting in body fluids. **Objective:** To determine the precision of XE-2100 in clinical samples and to evaluate the concordance and correlation for leukocyte counting between the analyzer and the conventional (manual) method. **Methodology:** Precision: This study used six clinical samples of fluid coming from peritoneal dialysis. From these samples, ten repetitions of each mentioned method were carried out, the same as with any body fluid samples. Concordance and correlation: Forty-two samples of fresh body fluid samples were analyzed and subjected to a cytological examination. The counting of leukocytes was carried out by means of the conventional method and with the XE-2100 device or equipment. The statistical test used was Pearson correlation test. **Results:** Precision: It was observed a variation coefficient of 8.76%. This observed coefficient was lower than the one reported by the manufacturer, who states that the coefficient should be less than the 30%. Correlation: The correlation coefficient for the leukocyte counting between the XE-2100 device and the

método convencional o manual fue de $r = 0.941$, el cual es significativo con un valor de $p \leq 0.041$ y se obtuvo como ecuación de regresión $y = 110.6302 + 0.7146 x$. **Conclusiones:** El equipo XE-2100 puede ser utilizado con confianza para llevar a cabo el conteo de leucocitos en líquidos corporales.

conventional or manual method was of $r = 0.941$, which is significant for a value of $p < 0.041$. Besides this, it was obtained an equation of regression of $y = 110.6302 + 0.7146 x$. **Conclusions:** The employed device or equipment XE-2100 may be used to perform leukocyte counting in corporal or body fluids with a lot of security and confidence or trust.

Introducción

Los líquidos corporales son fluidos biológicos que se forman en el organismo y que por los hallazgos en su composición se pueden asociar con trastornos específicos o enfermedades; pueden ser exudados o trasudados, según su composición.

De acuerdo a Paramothayan y colaboradores,¹ los exudados son una efusión de una cavidad corporal, causada por permeabilidad capilar aumentada o absorción linfática disminuida. Es identificado por un porcentaje del fluido a la proteína total sérica mayor de 0.5 y un porcentaje de fluido de deshidrogenasa láctica mayor de 0.6 o ambas. Son originados por procesos inflamatorios debidos, en general, a infecciones bacterianas o neoplasias y la densidad oscila entre 1.018 y 1.030.

Asimismo, mencionan que los trasudados son una efusión en una cavidad del cuerpo, causada por una presión hidrostática aumentada (presión sanguínea) o presión oncótica plasmática (presión osmótica ejercida por las proteínas en el plasma de la sangre). Es identificado por un porcentaje del fluido a la proteína total sérica menor de 0.5 y un porcentaje de fluido de deshidrogenasa láctica menor de 0.6 o ambas. Son originados por trastornos circulatorios que conducen a la congestión pasiva sin inflamación. Su origen es mecánico y la densidad oscila entre 1.006 y 1.015.¹

Respecto al análisis citológico, que incluye el conteo de leucocitos, eritrocitos y otras células, se analizan y se cuentan para determinar el tipo y cantidad existentes, así como para diagnosticar anomalías malignas o premalignas.

Las muestras del estudio citológico generalmente están formadas por muchos tipos de dis-

tintas células. Algunas de ellas son normales, mientras que otras indican patología. Existen casos en los que las células normales en un líquido muestran enfermedad en otro sitio. En la muestra se debe observar el número de células, su distribución, las modificaciones de la superficie, su tamaño, forma, aspecto y propiedades de tinción, adaptaciones funcionales e inclusiones. Asimismo, se examina el núcleo celular y se anotan las diferencias respecto a las cifras normales.

El estudio citológico de derrames, ya sea exudado o trasudado, es útil para determinar las causas de la recolección anormal. Es posible que se presenten derrames de la cavidad torácica, pleural y abdominal. El problema principal en el diagnóstico es distinguir las células malignas de las células mesoteliales reactivas.

Todo derrame contiene células mesoteliales, las cuales forman la capa escamosa del epitelio que cubre la superficie de todas las membranas serosas. Entre más crónica e irritante sea la enfermedad, las células mesoteliales serán más numerosas y atípicas. Con frecuencia también se observan histiocitos y linfocitos.

En este trabajo mencionaremos los métodos de análisis de citometría de flujo fluorescente y el de conteo en cámara de los líquidos de diálisis peritoneal, peritoneal, pleural, ascitis y líquido cefalorraquídeo.

Origen de los líquidos corporales. El líquido de diálisis peritoneal se obtiene del proceso de tratamiento de diálisis en pacientes con enfermedad renal crónica. La peritonitis es una de las principales complicaciones de la diálisis peritoneal (DP) y es una de las causas más frecuentes de pérdida de catéter peritoneal y la no continuidad

de la diálisis peritoneal. El análisis microscópico ha sido el estándar de oro para el conteo de leucocitos (*white blood cells*, WBC) en el líquido de diálisis peritoneal. Este análisis tiene una amplia variabilidad interobservador y, por lo tanto, es impreciso.²

Por otra parte, el líquido peritoneal o líquido ascítico es un ultrafiltrado del plasma, cuya formación depende del equilibrio entre la presión hidropática capilar, la presión oncótica plasmática, la permeabilidad capilar y la resorción linfática. Se produce en la cavidad abdominal para lubricar la superficie del tejido que recubre la pared abdominal y la cavidad pelviana, y que cubre la mayoría de los órganos del abdomen.

Uno de los líquidos de mayor importancia clínica es el líquido pleural, el cual se forma por filtración de plasma a través del endotelio capilar, a una velocidad controlada por la presión capilar, la presión osmótica plasmática y la permeabilidad capilar. Los recuentos leucocitarios en este tipo de líquido se han utilizado para distinguir los trasudados de los exudados, según un nivel de punto de corte de 1,000 leucocitos totales/ μL . Sin embargo, existe un solapamiento considerable y esta determinación tiene un valor limitado, el recuento diferencial es de utilidad moderada.³

Finalmente, el más importante: el líquido cefalorraquídeo. Éste circula por el espacio subaracnoideo, los ventrículos cerebrales y el canal medular central. Normalmente puede contener menos de 5 leucocitos/ mm^3 en adultos y en recién nacidos hasta 20 leucocitos/ mm^3 .

Generalidades del equipo de la serie XE Roche. Es un equipo analizador de células sanguíneas que utiliza la metodología de citometría de flujo. Para poder contar células en líquidos corporales es necesario instalar el software XT-pro y XE-pro, el cual es estándar en casi todos los analizadores de la serie XE Roche-Sysmex. En este punto es común el término de «conteo de fondo bajo» para los leucocitos; éste se obtiene del canal WBC/DIFF (del inglés: *white blood cell/Differential*) y no del canal WBC/BASO. Para colectar el líquido corporal, utilizar anticoagulante EDTA para el análisis de cuentas celulares (y diferencial manual).

Una de las limitaciones del equipo es que, en el rango muy bajo menor a 0.05 WBC, se pierde sensibilidad y los líquidos se tienen que analizar manualmente.

La estandarización de los métodos en el laboratorio clínico en la cual se evalúa, entre otras, la precisión, comparación y validación de los mismos, pretende eliminar posibles causas de variación, como son: el tiempo, el volumen de líquido, la superficie de conteo, la microscopia y la interpretación del personal, sin olvidar que se tiene que implementar un sistema de control de calidad interno y externo.⁴ Actualmente se cuenta con sistemas estandarizados que cumplen los lineamientos de la norma, uno de ellos es el sistema XE-2100, metodología eficiente para cuantificar el número de células por microlitro en los líquidos corporales. En nuestro laboratorio se determina la cantidad de células usando la cámara de conteo de Neubauer. Si bien ya es un método estandarizado, está sujeto a algunas variaciones, obteniendo una interpretación subjetiva, principalmente porque es una lectura visual.

La estandarización de los métodos en el laboratorio clínico en la cual se evalúa, entre otras, la precisión, comparación y validación de los mismos, pretende eliminar posibles causas de variación, como son: el tiempo, el volumen de líquido, la superficie de conteo, la microscopia y la interpretación del personal, sin olvidar que se tiene que implementar un sistema de control de calidad interno y externo.⁴ Actualmente se cuenta con sistemas estandarizados que cumplen los lineamientos de la norma, uno de ellos es el sistema XE-2100, metodología eficiente para cuantificar el número de células por microlitro en los líquidos corporales. En nuestro laboratorio se determina la cantidad de células usando la cámara de conteo de Neubauer. Si bien ya es un método estandarizado, está sujeto a algunas variaciones, obteniendo una interpretación subjetiva, principalmente porque es una lectura visual.

Material y métodos

Análisis de precisión. Se utilizaron seis muestras de líquido de diálisis, los cuales fueron recibidos en jeringas de 10 mL; posteriormente se trasvasaron a tubos con EDTA de 13 x 100 mm para procesarlos por aspiración directa en el equipo XE-2100 (marca SYSMEX). Se realizaron 10 repeticiones, utilizando un volumen de 300 μL por cada vez; entre cada aspiración se efectuó un conteo de fondo como lo especifica el fabricante. También se efectuó en el modo manual utilizando la cámara de conteo Neubauer.

Análisis de las muestras. Se procesaron 42 muestras de los siguientes líquidos: 24 líquidos

de diálisis, ocho líquidos pleurales, cinco peritoneales (ascitis), tres cefalorraquídeos, uno pericárdico y uno no especificado, provenientes de distintos servicios del Centro Médico ISSEMyM. El conteo proviene del canal de diferencial, dado que tiene más puntos decimales.

Algunos criterios para el análisis de las muestras fueron: a) Revisar la muestra por presencia de artefactos o partículas muy grandes, ya que éstas pueden tapar el analizador. b) Los líquidos sinoviales tratarlos con ácido hialurónico (SIGMA #H-3757 tipo VIII bovino estéril filtrado (añadir 5 mg a 0.5 para 1 mL de líquido puede ser arbitrario). c) Debido a que el resultado obtenido es un conteo total de células nucleadas no sólo de WBC, si existe la presencia de fibrina, se debe reportar como aproximadas y, por último, d) Reportar los resultados del analizador si son mayores a $WBC > 0.05 \times 10^3/\mu L$. El conteo de WBC se obtiene del canal WBC/DIFF de la pantalla de servicio.

Análisis estadístico. Para validar el conteo de leucocitos en líquidos corporales, se utilizaron en el análisis de precisión herramientas de estadística descriptiva y coeficiente de variación. Para la asociación entre los métodos se utilizó la correlación de Pearson. El método de regresión lineal fue empleado para comparar ambos métodos. Se utilizó el programa estadístico SPSS 15.0.

Resultados

Precisión. De las seis muestras recibidas, una vez que fueron procesadas, se obtuvieron valores de media, los cuales variaron con base en la cantidad de células que tenía el líquido. Se obtuvieron también el coeficiente de variación y la desviación estándar, con lo que se pudo analizar si el equipo era reproducible.

Correlación. El coeficiente de correlación para el conteo de leucocitos entre el equipo XE-2100 y el método convencional o manual fue de $r = 0.941$. El cual es significativo, con un valor de $p < 0.041$

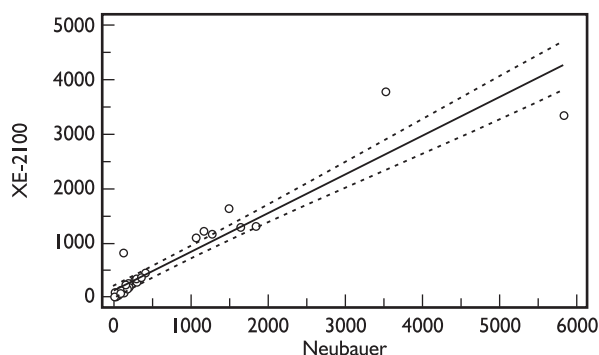


Figura 1. Regresión lineal mostrada por la línea continua, el 95% de intervalo de confianza mostrado por las líneas punteadas.

y se obtuvo como ecuación de regresión $y = 110.6302 + 0.7146 \times$ (Figura. 1). El equipo automatizado tiende a contar entre 1 a 10 células más que el método manual, ya que utiliza un volumen mayor al empleado en la cámara de Neubauer.

Discusión

En los laboratorios clínicos, uno de los procedimientos menos automatizado es el de líquidos corporales. Particularmente, el análisis citológico, lo que provoca una variabilidad entre el procedimiento de cada laboratorio, los reactivos, el personal que lo analiza, entre otros, lo que se traduce en imprecisión.

Los resultados obtenidos indican que todo líquido corporal (de dializado, peritoneal, pleural o cefalorraquídeo) procesado en el equipo XE-2100 tendrá una alta confiabilidad y, por lo tanto, una gran utilidad en la clínica del paciente.

Una de las limitaciones del equipo es que, en el rango muy bajo menor a 0.05 WBC, se pierde sensibilidad y los líquidos se tienen que analizar manualmente.

El uso de metodologías automatizadas para la obtención de resultados de análisis clínicos en especímenes humanos es de mayor confiabilidad y son las recomendadas por instituciones y organizaciones, tanto nacionales como internacionales.

Agradecimientos

A los estudiantes de la carrera técnica de laboratoristas químicos: Hernández Miraflores Adriana, Pozas Lechuga Ariana, Martínez Bernal Alejandro y a la técnica laboratorista Yolanda Ávila Carmona.

Referencias

1. Paramothayan NS, Barron J. New criteria for the differentiation between transudates and exudates. *J. Clin Pathol* 2002; 55: 69-71.
2. Penders J, Fiers T, Dhondt AM, Claeys G, Delanghe JR. Automated flow cytometry analysis of peritoneal dialysis fluid. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 463-468.
3. Henry JB. Diagnóstico y Tratamiento Clínico por el Laboratorio. 9a ed. España: Editorial Masson; 2000. p. 459-487.
4. Gómez-Gaviño V, Jiménez-López C, Vivar-Guzman NP, Sánchez-Rodríguez MA. Comparación del citómetro UF100i con el sistema Kova y el método convencional para el conteo de leucocitos y eritrocitos en orina. *Bioquímica* 2008;(33)2: 51-58.
5. Jonge R, Brouwer R, Smit M, Frankrijer-Merkerstijn, Dolhain RJE, Hazes JMW, Van Toorenenbergen, Lindemans J. Automated counting of white blood cells in synovial fluid. *Rheumatology* 2004; 43: 170-173.
6. Diario Oficial de la Federación. NOM-166-SSA1-1997. Para la Organización y Funcionamiento de los Laboratorios Clínicos. Jueves 13 de enero del 2000.