



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina

Escuela Profesional de Tecnología Médica

**Utilidad del azul de metileno para el recuento de
plaquetas en la cámara de Neubauer**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología
Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

AUTOR

Gian Carlos RAMIREZ UBILLUS

ASESORES

Mg. Carlos Ricardo NEIRA MONTOYA (Asesor)

Mg. Eduardo Eulogio SEDANO GELVET (Co-Asesor)

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Ramírez G. Utilidad del azul de metileno para el recuento de plaquetas en la cámara de Neubauer [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Escuela Profesional de Tecnología Médica; 2018.

Hoja de metadatos:

Autor: Gian Carlos Ramirez Ubillus

DNI: 74205486

Código ORCID: 0000-0002-9236-8667

Asesor: Mg. Carlos Ricardo Neira Montoya

Código ORCID: 0000-0001-6509-742X

Coasesor: Mg. Eduardo Eulogio Sedano Gelvet

Código ORCID: 0000-0002-2131-0783

-El autor no pertenece a ningún grupo de investigación.

-El presente estudio fue autofinanciado.

-El estudio se realizó en el Hospital Docente Madre Niño San Bartolomé, ubicado en Avenida Alfonso Ugarte 825, Cercado de Lima 1500, cuyas coordenadas geográficas son:

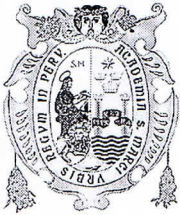
En grados decimales (GD): -Latitud -12.049777

-Longitud -77.041866

En grados, minutos y segundos (GMS): -Latitud Sur, 12°2'59.195"

-Longitud Oeste, 77°2'30.716"

-El presente estudio se realizó durante el mes de Julio del 2018.



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
 Universidad del Perú, Decana de América
Facultad de Medicina
Escuela Profesional de Tecnología Médica
 "Año del diálogo y la reconciliación nacional"



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Conforme a lo estipulado en el Art. 113 inciso C del Estatuto de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (R.R. No. 03013-R-16) y Art. 45.2 de la Ley Universitaria 30220. El Jurado de Sustentación de Tesis nombrado por la Dirección de la Escuela Profesional de Tecnología Médica, conformado por los siguientes docentes:

Presidente: Lic. Boris Moises Valdivia Vizarraga
 Miembros: Dr. Justo Angelo Ascarza Gallegos
 Lic. Justo Tobias Alegre Torres
 Asesor : Mg. Carlos Ricardo Neira Montoya

Se reunieron en la ciudad de Lima, el día 05 de diciembre 2018, procediendo a evaluar la Sustentación de Tesis, titulado **"UTILIDAD DEL AZUL DE METILENO PARA EL RECUENTO DE PLAQUETAS EN LA CÁMARA DE NEUBAUER"**, para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología Médica en el Área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica del Interno:

GIAN CARLOS RAMIREZ UBILLUS

Habiendo obtenido el calificativo de:

17

 (en números)

Diecisiete

 (en letras)

Que corresponde a la mención de: *Muy Bueno*

Quedando conforme con lo antes expuesto, se disponen a firmar la presente Acta.

 Presidente Lic. Boris Moises Valdivia Vizarraga	 Miembro Dr. Justo Angelo Ascarza Gallegos
 Miembro Lic. Justo Tobias Alegre Torres	 Asesor (a) de Tesis Mg. Carlos Ricardo Neira Montoya



DEDICATORIA

A mi madre Rubila y a mi padre Toribio por brindarme amor, paciencia, dedicación y el apoyo incondicional para poder lograr cada meta trazada.

A mis hermanos, primos, tíos y abuelos, que con sus consejos me ayudan a poder mejorar personal y profesionalmente día a día.

A mi enamorada Stefany, quien durante todos estos años siempre ha caminado conmigo y me ha apoyado en cada reto a vencer.

A mi Tío Pepe, quien ahora, me guía desde el cielo para poder ser un excelente tecnólogo médico, así como lo fue él.

AGRADECIMIENTOS

Al TM. Mg. Carlos Ricardo Neira Montoya y al TM. Mg. Eduardo Eulogio Sedano Gelvet por la asesoría y coasesoría brindada respectivamente, además de contribuir con mi desarrollo personal, profesional y enseñarme que el conocimiento no tiene barreras.

Al TM Dr. José Manuel Córdor Capcha por la asesoría brindada en estadística y elaboración de un trabajo de investigación.

Al TM Lic. Carlos Orlando Velasquez Figueroa por la asesoría brindada en control de calidad en laboratorio clínico.

Al TM Lic. Diego Arturo Paniagua Napán, representante de la casa comercial Sistemas Analíticos, por la donación de controles internos y facilitación de información interlaboratorial sobre este lote.

Al TM Lic. Fredy Barboza León y al TM Lic. Augusto Marimón Pacheco por el apoyo en los recuentos plaquetarios.

A la empresa Biosix Import S.A.C por la donación de reactivos químicos.

A cada persona, amigos, compañeros de internado, técnicos y licenciados que me apoyaron incondicionalmente para poder realizar este trabajo de investigación.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas y siglas

Lista de tablas

Lista de gráficos

Resumen

Abstract

I. INTRODUCCIÓN.....	01
1.1. Métodos para el recuento plaquetario.....	01
1.1.1. Métodos manuales indirectos.....	01
1.1.2. Métodos manuales directos.....	02
1.1.3. Métodos automatizados.....	04
1.2. Azul de Metileno.....	06
1.2.1. Fundamento y utilidad de la coloración.....	07
1.3. Importancia y problemática de los recuentos de plaquetas.....	07
II. OBJETIVOS.....	09
2.1. Objetivo general.....	09
2.2. Objetivos específicos.....	09
III. MÉTODOS.....	10

3.1. Diseño.....	10
3.2. Población.....	10
3.3. Muestra.....	10
3.3.1. Tipo de muestreo.....	10
3.3.2. Determinación de la muestra.....	10
3.4. Variables.....	11
3.4.1. Variable Independiente.....	11
3.4.2. Variable Dependiente.....	11
3.4.3. Criterios de Inclusión.....	12
3.4.4. Criterios de Exclusión.....	12
3.4.5. Operacionalización de variables.....	12
3.5. Técnicas e instrumentos.....	13
3.6. Plan de procedimientos.....	13
3.6.1. Desarrollo del instrumento de obtención de datos.....	13
3.6.2. Obtención de datos.....	14
3.6.3. Procedimientos.....	15
3.7. Análisis de datos.....	18
3.7.1. Procesamiento de datos.....	18
3.8. Consideraciones éticas.....	22
3.8.1. Aprobación para la realización del presente trabajo de investigación por parte de la jefatura del servicio de Patología Clínica.....	22
3.8.2. Aprobación para la realización del presente trabajo de investigación por parte de la oficina de Docencia e Investigación.....	22

IV. RESULTADOS	23
4.1. Morfología, refringencia y coloración plaquetaria según el método RDMP.....	23
4.2. Establecimiento de los rangos de recuento, cálculo de la media aritmética ± desviación estándar y mediana.....	32
4.3. Determinación de los coeficientes de variación interobservador para el método RDMP.....	33
4.4. Aplicación de Test de normalidad o Contraste de normalidad.....	36
4.5. Aplicación de estadística NO PARÁMETRICA.....	39
4.6. Determinación del coeficiente de correlación de Spearman.....	41
4.7. Análisis de regresión lineal.....	43
4.8. Aplicación del Test de Bland - Altman.....	47
4.9. Determinación del desempeño de calidad e indicadores de desempeño.....	49
V. DISCUSIÓN	54
VI. CONCLUSIONES	56
VII. RECOMENDACIONES	57
VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS	59
IX. ANEXOS	64

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

%	Porcentaje
≤	Menor igual que
fL	Femtolitro
uL	Microlitro
g/L	Gramo por litro
°C	Grados centígrados
CD	Cluster of differentiation
PLTO	Recuento óptico de plaquetas
RDOP	Recuento directo original de plaquetas
RDMP	Recuento directo modificado de plaquetas
RILP	Recuento indirecto mediante lámina periférica
Media	Media aritmética
DS	Desviación estándar
CV	Coeficiente de variación
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
R.A.	Grado reactivo analítico
CLIA	Clinical Laboratory Improvement Amendments
ICSH	The International Council for Standardization in Haematology
ISLH	The International Society for Laboratory Hematology

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Establecimiento de los rangos de recuento, media aritmética \pm desviación estándar y mediana.....	32
Tabla 2. Determinación de los coeficientes de variación interobservador para el método RDMP.....	35
Tabla 3. Aplicación del Test de normalidad o contraste de normalidad Kolmogorov-Smirnov (K-S).....	36
Tabla 4. Aplicación del Test de normalidad o contraste de normalidad Shapiro-Wilk (S-W).....	37
Tabla 5. Aplicación del Test de Friedman.....	39
Tabla 6. Aplicación del Test <i>post-hoc</i> de Dunn.....	40
Tabla 7. Determinación del coeficiente de correlación de Spearman.....	42
Tabla 8. Análisis de regresión lineal.....	43
Tabla 9. Test de Bland-Altman (análisis de diferencias individuales).....	47
Tabla 10. Media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación del método “RDOP” a partir de los controles internos.....	50

Tabla 11. Media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación del método “RDMP” a partir de los controles internos.....50

Tabla 12. Media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación del método “RILP” a partir de los controles internos.....51

Tabla 13. Media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación de la información interlaboratorial según los niveles establecidos.....51

Tabla 14. Determinación del desempeño de calidad e indicadores de desempeño para el método “RDOP” según los niveles establecidos.....52

Tabla 15. Determinación del desempeño de calidad e indicadores de desempeño para el método “RDMP” según los niveles establecidos.....52

Tabla 16. Determinación del desempeño de calidad e indicadores de desempeño para el método “RILP” según los niveles establecidos.....53

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Comparación de la media aritmética, desviación estándar y mediana para métodos de recuento de plaquetas utilizados.....33
- Gráfico 2.** Comparación de los coeficientes de variación (CV) interobservador del método “RDMP”.....34
- Gráfico 3.** Histograma de frecuencias y curva de distribución del método “RDOP”.....37
- Gráfico 4.** Histograma de frecuencias y curva de distribución del método “RDMP”.....38
- Gráfico 5.** Histograma de frecuencias y curva de distribución del método “RILP”.....38
- Gráfico 6.** Histograma de frecuencias y curva de distribución del método “PLTO”.....39
- Gráfico 7.** Diagrama “caja y bigotes” de los métodos “PLTO”, “RDOP”, “RDMP” y “RILP”.....41
- Gráfico 8.** Comparación de los coeficientes de correlación de Spearman de los métodos “RDOP”, “RDMP” y “RILP” con el método de recuento “PLTO”.....43
- Gráfico 9.** Análisis de regresión lineal del método “PLTO” en comparación con el método “RDOP”.....44

Gráfico 10. Valores residuales del método “PLTO” en comparación con el método “RDOP”.....	44
Gráfico 11. Análisis de regresión lineal del método “PLTO” en comparación con el método “RDMP”.....	45
Gráfico 12. Valores residuales del método “PLTO” en comparación con el método “RDMP”.....	45
Gráfico 13. Análisis de regresión lineal del método “PLTO” en comparación con el método “RILP”.....	46
Gráfico 14. Valores residuales del método “PLTO” en comparación con el método “RILP”.....	46
Gráfico 15. Test de Bland-Altman: “Difference plot” para las metodologías “PLTO” y “RDOP”.....	48
Gráfico 16. Test de Bland-Altman: “Difference plot” para las metodologías “PLTO” y “RDMP”.....	48
Gráfico 17. Test de Bland-Altman: “Difference plot” para las metodologías “PLTO” y “RDMP”.....	49

RESUMEN

Antecedentes: Los analizadores hematológicos automatizados son capaces de realizar recuentos plaquetarios con gran precisión y exactitud. Sin embargo, la correlación y concordancia disminuye debido a la presencia de interferentes (microcitos, plaquetas gigantes, fragmentos leucocitarios, satelitismo plaquetario, entre otros). Por lo tanto, se requiere de metodologías adicionales que puedan confirmar los recuentos plaquetarios como son el frotis sanguíneo (aspecto cualitativo) y un recuento directo mediante la cámara de Neubauer (aspecto cuantitativo). **Objetivos:** Demostrar la utilidad del azul de metileno para el recuento de plaquetas en la cámara de Neubauer. **Materiales y métodos:** 59 recuentos plaquetarios fueron realizados en los laboratorios de Hematología y Emergencias del hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé mediante 4 metodologías: un recuento óptico de plaquetas “PLTO”, un recuento indirecto mediante lámina periférica “RILP” y dos recuentos directos mediante la cámara de Neubauer “RDOP” y “RDMP”. Se utilizó estadística descriptiva e inferencial para realizar comparaciones entre los grupos. **Resultados:** Se observó diferencia significativa en la distribución de las 4 metodologías y al realizar un análisis *post-hoc* se encontró similitud entre los métodos “PLTO” y “RDMP”. Los métodos “RDOP”, “RDMP” y “RILP”, mostraron una correlación positiva al ser comparados con el método “PLTO”. Adicionalmente, el Test de Bland-Altman demostró sobre todo, que el método “RDMP” presentó una alta concordancia con el método “PLTO”. Finalmente, se observó que solo el método “RDMP” presentó un desempeño de calidad aceptable. **Conclusiones:** El método “RDMP”, mostró mayor fiabilidad estadística, indicadores de desempeño aceptables, correlación positiva y concordancia con la metodología automatizada. **Palabras clave:** Plaquetas, recuento de plaquetas, azul de metileno, correlación de métodos.

ABSTRACT

Background: Automated hematology analyzers are able to produce platelet counts with great precision and accuracy. However, these analyzers can produce erroneous counts due to the presence of interferences (microcytes, giant platelets, leukocytic fragments, platelet satellitism and so forth). Therefore, additional methodologies are required to confirm platelet counts such as blood smear (qualitative aspect) and a direct count using the Neubauer chamber (quantitative aspect). **Objectives:** To demonstrate the utility of methylene blue for the platelet count in the Neubauer chamber. **Materials and methods:** 59 platelet counts were executed in the Hematology and Emergency laboratories of the San Bartolome National Mother-Child Teaching Hospital by 4 methodologies: an optical platelet count "PLTO", an indirect count by blood smear "RILP" and two direct counts using the Neubauer chamber "RDOP" and "RDMP". Descriptive and inferential statistics were used to make comparisons between the groups. **Results:** A significant difference was observed in the distribution of the 4 methodologies and after applying *post-hoc* analysis, a similarity between the "PLTO" and "RDMP" methods was achieved. The "RDOP", "RDMP" and "RILP" methods, showed positive correlation with the "PLTO" method. In addition to this, the Bland-Altman test demonstrated above all, that the "RDMP" method presented a high concordance with the "PLTO" method. Finally, it was observed that only the "RDMP" method presented acceptable performance in terms of quality for the platelet count. **Conclusions:** The "RDMP" method showed greater statistical reliability, clinical significance, acceptable performance indicators, positive correlation and concordance with the automated methodology. **Key words:** Platelets, platelet count, methylene blue, correlation of methods.

I. INTRODUCCIÓN

Las plaquetas son pequeños fragmentos citoplasmáticos, irregulares, carentes de núcleo, de 2-3 μm de diámetro. En la actualidad, se sabe que provienen de la fragmentación de los megacariocitos, que la vida media plaquetaria oscila entre 8 y 11 días y que el recuento plaquetario es muy importante para el apoyo o ayuda en el diagnóstico de trastornos involucrados con estos fragmentos celulares, en la toma de decisiones médicas para transfusiones de sangre, cirugías, tratamiento ante enfermedades hereditarias relacionadas con trombocitopenias, entre otros. A lo largo de la historia, se han descrito diversos métodos para realizar el recuento plaquetario, entre los más importantes se encuentran: ¹⁻²

1.1. Métodos para el recuento plaquetario

1.1.1. Métodos manuales indirectos

Los métodos manuales indirectos utilizan frotices que provienen de sangre venosa o capilar. Estos frotices de sangre periférica proveen como principales ventajas, otorgar información útil acerca de características morfológicas, como por ejemplo, macroplaquetas presentes en algunas neoplasias mieloproliferativas crónicas y macrotrombocitopenia, evaluar la agregación plaquetaria producida por EDTA asociada a un falso recuento disminuido de plaquetas, satelitismo plaquetario (plaquetas adheridas alrededor del neutrófilo), entre otros. La principal desventaja es que presentan una mayor imprecisión e inexactitud en el recuento de plaquetas, en comparación con los métodos directos y los métodos automatizados. Entre los más importantes están:

- Método de Fonio.
- Método de Dameshek-modificación de Fonio.
- Método de Factor 20 000.

1.1.2. Métodos manuales directos

Utilizan la cámara de Neubauer, también llamada hemocitómetro o cámara cuentaglobos y diferentes líquidos de dilución para contar el número de plaquetas por milímetro cúbico de sangre. Entre los más importantes se tiene:

- Método de REES ECKER

Es un método de recuento directo de plaquetas que utiliza un líquido diluyente en solución hipotónica constituido por varios componentes. Su acción es provocar plasmólisis de los glóbulos rojos, impedir la agregación plaquetaria y su adhesión a otros elementos.³ Composición:

Azul de Cresilo Brillante R.A.....1 g/L.

Citrato de Sodio R.A.....38 g/L.

Formol neutro.....22 mL.

Agua destilada.....978 mL.

Como principal ventaja se tiene que las plaquetas se observaran de color azul refringentes bajo el microscopio óptico de campo claro o bajo un microscopio de contraste de fases. Como principales desventajas se tiene que el recuento todavía debe ser realizado por personal experimentado, debido a que pueden ser confundidos por otros elementos, como partículas de polvo, leucocitos o bacterias; no siempre se lisan todos los hematíes y la disponibilidad de los reactivos por parte de los laboratorios de hematología es variable.

- Método de ROVATTI

Es un método de recuento directo de plaquetas que utiliza un líquido diluyente en solución hipotónica. Su acción es provocar lisis de los glóbulos rojos, impedir la agregación plaquetaria y su adhesión a otros elementos.⁴ Composición:

Azul de Cresilo Brillante R.A.....0.01 g.

Procaína o novocaína.....2,0 g.

Solución fisiológica.....100 mL.

Como principal ventaja se tiene que las plaquetas se observaran refringentes bajo el microscopio óptico de campo claro o bajo un microscopio de contraste de fases y como principales desventajas se tiene que el recuento todavía debería ser realizado por personal experimentado, debido a que pueden ser confundidos por otros elementos, como partículas de polvo, leucocitos o bacterias; no siempre se lisan todos los hematíes y la disponibilidad de los reactivos por parte de los laboratorios de hematología es variable.

- **Método de BRECHER Y CRONKITE**

Es un método de recuento directo de plaquetas que utiliza un líquido diluyente compuesto por oxalato de amonio y agua destilada. Su acción es provocar plasmólisis de los glóbulos rojos, degeneración nuclear de los leucocitos, impedir la agregación plaquetaria y su adhesión a otros elementos.⁵⁻¹¹

Composición:

Oxalato de amonio.....1 g.

Agua destilada.....100 mL.

Como principal ventaja se tiene que las plaquetas se observaran refringentes bajo el microscopio óptico de campo claro y con una mayor refringencia mediante un microscopio de contraste de fases; el oxalato de amonio asegura el aclaramiento del medio por hemólisis de los hematíes. Como principales desventajas se tiene que el recuento todavía debería ser realizado por personal experimentado, debido a que pueden ser confundidos por otros elementos, como partículas de polvo, leucocitos o bacterias.

1.1.3. Métodos automatizados

- Recuento por impedancia

Fue el primer método automatizado descrito. Su creador, Wallace H. Coulter sentó las bases del principio de la impedancia en 1947. Coulter determinó que la carga eléctrica podía ser utilizada para determinar el tamaño y número de micropartículas en una solución.

Cuando las células están suspendidas en una solución electrolítica y pasan a través de una apertura, el cambio en la impedancia eléctrica es detectado en esa zona, entonces, cada célula da una señal de impedancia, el cual es proporcional al volumen de las células detectadas, como consecuencia, este método puede ser usado para obtener tanto el tamaño como el número de células. En un inicio, una de las utilidades fue su aplicación para el recuento de hematíes y leucocitos, más tarde se aplicó para el recuento de plaquetas, pero se hacía uso de plasma rico en plaquetas. Posteriormente, se mejoró esta tecnología mediante el enfoque hidrodinámico y para la corrección de doble coincidencia, para la discriminación de hematíes y plaquetas, obteniendo un recuento más exacto de plaquetas en sangre periférica.¹²

Mediante este método, las partículas menores a 20 fL, los cuales incluyen, como por ejemplo, fragmentos de glóbulos rojos, microcitos, fragmentos de células leucémicas, crioglobulinas y bacterias que pueden ser contadas como plaquetas, trayendo como resultado, un recuento elevado.

- Recuento óptico unidimensional y bidimensional

Mediante la citometría de flujo, las células son contadas cuando están en un diluyente adecuado y pasan a través de un estrecho haz de luz (Laser de Helio – Neón) para el análisis de plaquetas unidimensional. La iluminación y dispersión de luz que generan son medidas en un ángulo. Esto conduce a la evaluación del número de pulsos eléctricos generados en proporción al número y volumen de células. La mejora, en comparación con el método automatizado anterior, es que

mediante la dispersión de luz en dos dimensiones se logra la discriminación de plaquetas y otras partículas diferentes a esta. La medición de estas dos dispersiones de luz es convertida en información de volumen (medida del tamaño) e índice de refractividad (densidad de la plaqueta).

Entonces, esta metodología es usada para distinguir plaquetas, macroplaquetas, hematíes, fragmentos de células y desechos. Como principal utilidad, el recuento óptico de plaquetas ha mejorado la exactitud de recuento en muestras con macroplaquetas.¹³

- **Recuento óptico de plaquetas fluorescentes – citometría de fluorescencia (Optical light scatter/fluorescence)**

Este método para el recuento de plaquetas utiliza una tinción de polimetina y realiza un conteo simultáneo de reticulocitos, hematíes y plaquetas fluorescentes mediante la tinción de los ácidos nucleicos de células reticuladas y gránulos plaquetarios.

En la celda de flujo, cada célula pasa a través de un rayo de luz de un láser semiconductor, luego, la intensidad de la fluorescencia de cada célula es analizada, lo cual conduce a la separación de plaquetas de eritrocitos y reticulocitos. La tinción fluorescente de las plaquetas no solo lleva a diferenciarlas de partículas no plaquetarias, sino también a la detección de plaquetas gigantes.¹³

- **Recuento inmunológico de plaquetas**

Esta metodología utiliza sangre anticoagulada con EDTA con anticuerpos monoclonales antiplaquetarios, los cuales, están conjugados con una sustancia denominada fluorocromo. El Isotiocianato de fluoresceína (FITC) es el más utilizado.

Debido a la capacidad de estos anticuerpos monoclonales (anti CD-41 y anti CD-61) para discriminar inequívocamente a las plaquetas le da una marcada solidez en cuanto a precisión y exactitud para el recuento plaquetario. La

coincidencia (plaquetas: hematíes y hematíes: hematíes) debe ser eliminada por selección de dilución óptima, 1000 eventos de plaquetas son contadas para asegurar la exactitud incluso en muestras trombocitopénicas. A partir de ello, el recuento de plaquetas se deriva mediante la razón de plaquetas fluorescentes y hematíes, en la muestra. El recuento de plaquetas inmunológico es simple, rápido, seguro y fácilmente transferible a algún laboratorio con un citómetro de flujo. La principal desventaja es el alto costo de los anticuerpos monoclonales y un citómetro de flujo. Adicionalmente, existe una buena correlación con el existente método directo recomendado para un recuento normal y bajo de plaquetas.¹³

1.2. Azul de Metileno

Es un colorante básico que ha sido reconocido hasta el día de hoy, como un importante colorante nuclear. Teóricamente, su estructura corresponde a una tetrametilitionina y tiende a oxidarse muy fácilmente que prácticamente es imposible obtenerlo en su forma pura. Aquí su estructura:



En el comercio se encuentra, generalmente, como una doble sal, el cloruro de zinc y azul de metileno. Esta sal de zinc le permite ser menos soluble a 26°C en alcohol (1.48%) que en agua (3.55%).

El azul de metileno es quizás, el colorante nuclear más usado, después de la hematoxilina. Su uso es diverso, no solo como colorante nuclear en patología, sino también como colorante para bacterias, antiséptico tópico, cicatrizante interno, en acuicultura (como antifúngico) y también para tratar animales contra infecciones causados por ciertos parásitos.¹⁴

1.2.1. Fundamento y utilidad de la coloración

Un colorante básico, como el azul de metileno, está formado por la asociación de un cromógeno de baja intensidad y carácter débilmente ácido, con grupos auxocromos catiónicos fuertemente básicos que son los responsables de la carga global del colorante. Por lo tanto, se utilizan para colorear estructuras ácidas, como por ejemplo, las moléculas contenidas en el interior de los núcleos celulares en forma de ácidos nucleicos, específicamente, los grupos fosfóricos ácidos.¹⁵

Para el propósito de este estudio, la oxidación de este colorante por agentes como el bicarbonato de sodio y sometimiento a ebullición, generará la presencia de azules (derivados con un menor número de grupos metilo) y se estima, que tienen una mayor afinidad e interacción (atracción electrostática) con las moléculas de glucosaminoglicanos ácidos no sulfatados (ácido siálico) que se encuentran en la membrana plaquetaria.¹⁶ De esta forma, se pueden reconocer a las plaquetas en la cámara de Neubauer no sólo por su refringencia y morfología, sino también ahora, por su color.

1.3. Importancia y problemática sobre los recuentos de plaquetas

Entre los métodos de recuento indirecto (lámina periférica), está el método "Red blood cells/Platelet Ratio",¹⁷ que ya ha sido comprobado que guarda una buena correlación con la metodología automatizada y fue usado en este estudio. Sin embargo, en Perú, no se tiene estandarizado que método utilizar, como consecuencia, los reportes pueden presentar una concordancia débil, así lo demostró Conde S. y Rodríguez R.¹⁸

Por otro lado, entre los métodos de recuento directo (cámara de Neubauer), se encuentra el método de "Brecher y Cronkite", el cual, es recomendado por *The International Council for Standardization in Haematology* (ICSH) y *The International Society for Laboratory Hematology* (ISLH).¹⁹ No obstante, se requiere de un microscopio de contraste de fases, ya que si se usa

un microscopio óptico de solo campo claro, existe dificultad para reconocer a las plaquetas (carecen de color).

Adicionalmente, se propone un nuevo método directo, el método “RDMP”, y se realiza este primero estudio que está dirigido para demostrar que es posible contar plaquetas de manera general (recuentos normales, altos o bajos), haciendo uso de un microscopio de campo claro, en el cual, se puedan reconocer a las plaquetas de manera fácil y rápida por su color (azul) y refringencia; y que utilice reactivos baratos (costo de la prueba aproximadamente 0.5 dólares americanos) para que esté al alcance, no solamente, de los pacientes con escasos recursos económicos, sino también de los laboratorios con una implementación muy básica para realizar pruebas hematológicas importantes en donde esté incluido el recuento de plaquetas, como el hemograma. Por ejemplo, el Perú presenta 2296 centros de salud, que por definición, los laboratorios clínicos no cuentan con equipos automatizados, según la última Norma Técnica de Salud N°021 - MINSA.²⁰

Es por ello, que se planteó como objetivo de este estudio, evaluar la confiabilidad generada por la estimación del recuento plaquetario del método “RDMP” al compararlo con otras formas de recuento estandarizadas y así, que sea útil para confirmar recuentos generados por un equipo automatizado o cuando el laboratorio no cuente con éste, el cual es frecuente todavía en algunas regiones del Perú.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar la utilidad del azul de metileno para el recuento de plaquetas en la cámara de Neubauer.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar el coeficiente de variación interobservador en los resultados reportados con azul de metileno para el recuento de plaquetas en la cámara de Neubauer.
- Comparar los recuentos plaquetarios generados por las diferentes metodologías empleadas.
- Determinar la correlación, concordancia y significancia clínica generadas por las diferentes metodologías empleadas.
- Demostrar que las plaquetas se observan refringentes y/o de color azul en la cámara de Neubauer.

III. MÉTODOS

El presente estudio fue realizado en los laboratorios de Hematología y Emergencias del hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé, durante el mes de julio del 2018 y contó con las siguientes características:

3.1 Diseño

Estudio de enfoque cuantitativo, descriptivo y de corte transversal.

3.2. Población

La población está integrada por 150 pacientes a los cuales se les realizó un examen hematológico de laboratorio en donde esté incluido el recuento de plaquetas.

3.3. Muestra

Está conformado por 59 muestras de sangre venosa extraídas con EDTA dipotásico o tripotásico.

3.3.1. Tipo de muestreo

Probabilístico de tipo aleatorio simple.

3.3.2. Determinación de la muestra

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 \times N \times p \times q}{d^2 \times (N - 1) + Z_{\alpha}^2 \times p \times q}$$

N =Tamaño de la población q =Probabilidad de fracaso

Z =Nivel de confianza p =Probabilidad de éxito o proporción esperada

d =Precisión (error máximo admisible en términos de proporción)

$$d = 0.05$$

$$N = 150$$

$$p = 0.5$$

$$Z_{\alpha=0.05} = 1.96$$

$$q = 0.5$$

Reemplazando los valores identificados:

$$n = \frac{(1.96)^2 \times 150 \times 0.5 \times 0.5}{(0.1)^2 \times (149) + (1.96)^2 \times 0.5 \times 0.5}$$

$$n = 58.790 \approx 59$$

3.4. Variables

3.4.1. Variable Independiente

- Recuento de plaquetas en la cámara de Neubauer.

3.4.2. Variable Dependiente

- Utilidad del azul de metileno para el recuento de plaquetas en la cámara de Neubauer.

3.4.3. Criterios de Inclusión

- Muestras de sangre venosa extraídas con EDTA dipotásico o tripotásico con menos de 4 horas de almacenamiento.
- Muestras de sangre venosa extraídas de pacientes en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé durante el mes de julio del 2018.
- Determinación del recuento plaquetario mediante metodología óptica, lámina periférica y cámara de Neubauer.

3.4.4. Criterios de Exclusión

- Presencia de coágulos en las muestras extraídas con EDTA dipotásico o tripotásico.
- Muestras de sangre venosa extraídas con otro tipo de anticoagulante.
- Muestras de sangre venosa lipémicas, ictéricas o hemolizadas.
- Volumen inadecuado de las muestras de sangre venosa (incumplimiento de la proporción EDTA/Sangre).

3.4.5. Operacionalización de variables

Anexo 1

3.5. Técnicas e instrumentos

Ficha de recolección de datos. **Anexo 2**

3.6. Plan de procedimientos

3.6.1. Desarrollo del instrumento de obtención de datos (ficha de recolección)

Es una ficha para evaluar la coloración, refringencia y cantidad de plaquetas, el cual se generó específicamente para este trabajo de investigación, entonces, se procedió a realizar los procedimientos de validación y confiabilidad.

A) Validación

El instrumento se validó aplicando la técnica de Juicio de Expertos. Para ello, se seleccionaron a tres expertos profesionales especialistas en el área objeto de estudio e investigación a quienes se les proporcionó el presente trabajo de investigación y la ficha de recolección de datos para su revisión y evaluación. Los jueces expertos calificaron por unanimidad una valoración a criterios que figuran en el documento establecido y otorgado por la Escuela Profesional de Tecnología Médica, perteneciente a la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Los resultados fueron calificados como aceptables y válidos. **Anexo 3**

B) Confiabilidad del instrumento

Se aplicó la ficha de recolección de datos a 30 muestras piloto. Posteriormente, se obtuvo el coeficiente del Alfa de Cronbach ($\text{Alfa}=0.895$), el cual indica que el nivel de consistencia interna del instrumento para evaluar la coloración y refringencia empleada es alto, y por consiguiente lo califica como idóneo y apto para su aplicación en este estudio.

3.6.2. Obtención de datos

Después de ser aprobados todos los permisos debidos para la realización de este trabajo de investigación en el hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé, se procedió a la obtención de datos y tuvo las siguientes características:

- En primer lugar, se entregó una solicitud de participación a los 2 participantes de este estudio (**anexo 4**), los cuales fueron, 1 Tecnólogo médico del área de laboratorio de hematología y 1 Tecnólogo médico del área de laboratorio de emergencias, luego se entregaron las fichas de recolección de datos y el procedimiento operativo estandarizado (POE).
- Después del registro de las muestras, se procedió a realizar el frotis sanguíneo para un recuento indirecto de plaquetas, luego se usó el analizador hematológico automatizado Abbott CELL-DYN Ruby.
- Posteriormente, se llevó a cabo el método de Brecher y Cronkite, que figura en este estudio con el nombre de "original" y el método G&S, que es un método de recuento directo de plaquetas propuesto por el autor de este estudio.
- Después de recolectar todas las muestras, se hizo un recuento de 20 muestras por el método "modificado", en paralelo, por los dos tecnólogos médicos para poder calcular el rango de los coeficientes de variación interobservadores.
- Debido a que este estudio tuvo un muestreo probabilístico de tipo aleatorio simple, se registraron, procesaron y anotaron los resultados correspondientes de todas las muestras sanguíneas que se encontraron dentro del marco de criterios de inclusión/exclusión, sin que el orden de llegada intervenga.
- La frecuencia de obtención de datos fue dos veces por semana durante el mes de julio del 2018.

- Finalmente, con los controles internos donados, se procedió a realizar 20 recuentos mediante las metodologías “RDOP”, “RDMP” y “RILP” en cada uno de los niveles (bajo, normal y alto) para compararlos con información interlaboratorial realizada con la metodología “PLTO” y el requisito de la calidad para el recuento de plaquetas dado por CLIA.

3.6.3. Procedimientos

A. Recuento óptico de plaquetas

El equipo hematológico automatizado que se usó fue el Abbott CELL-DYN Ruby, que mediante sistema de aspiración abierto, absorbe ≤ 150 uL de sangre total y la metodología de recuento es debido a la dispersión de luz en 2 dimensiones (recuento óptico bidimensional).

Para más especificaciones propias del procedimiento de recuento en este equipo, ver **anexo 5**.

B. Recuento manual directo: Brecher y Cronkite

En este trabajo de investigación figura con el nombre de “original” para diferenciarlo de otros métodos alternativos creados a partir de éste.^{5-7, 9}

Este recuento fue realizado a partir de las indicaciones descritas en los artículos “The reproducibility and constancy of the platelet count” y “Morphology and Enumeration of Human Blood Platelets”.²¹⁻²² Para más especificaciones propias del procedimiento mediante esta metodología, ver **anexo 6**.

C. Recuento manual directo “modificado” propuesto, mediante uso del azul de metileno de “HAMA”

Este tipo de azul de metileno modificado propuesto por el autor de este estudio, autodenominado Azul de Metileno de "HAMA", se preparó de la siguiente forma: Diluir 1 gr de azul de metileno en 100 mL de agua destilada, agregar 1 gr de bicarbonato de sodio y mezclar durante 1 minuto, luego, llevar la solución a ebullición (100°C), una vez logrado, cronometrar 30 minutos. Finalmente, dejar enfriar la solución a temperatura ambiente, mezclar durante 1 minuto y filtrar con doble papel Whatman N°2 o grado 2. La solución está lista para su uso y su almacenamiento es a T° ambiente.

Este método de recuento directo de plaquetas propuesto por el autor de este estudio y que figura también como recuento directo modificado de plaquetas "RDMP" se estandarizó de la siguiente manera:

1. Se realiza una dilución, previa homogenización de la muestra sanguínea, con oxalato de amonio al 1% (mover esta solución antes de su uso por unos breves segundos también), en tubos de plástico de 12x75 mm (no se debe usar vidrio debido a que las plaquetas pueden adherirse a las paredes del tubo), de tal manera que por cada 20 uL de sangre, se debe agregar 870 uL de oxalato de amonio al 1%. Limpiar el exceso de sangre en la superficie del tip o puntilla con un pedazo de papel toalla antes de mezclar con el oxalato de amonio al 1%.
2. Luego, se homogeniza la mezcla mediante el uso de una micropipeta (fijada a 870 uL) o mediante el uso de parafilm durante 20 segundos y se dejó reposar el tubo a temperatura ambiente por 15 minutos.
3. Se agrega 30 uL del azul de metileno de "HAMA" y se mezcla 5 veces mediante el uso de una micropipeta o mediante el uso de parafilm. Inmediatamente después, se mide 20 uL de la solución total (limpiar brevemente el exceso en la superficie del tip o puntilla con un pedazo de papel toalla), se carga en un sólo lado de la cámara de Neubauer (deberá sobrar muy poco de solución en el tip) y se deja reposar en una placa Petri de vidrio o plástico con un pequeño trozo de algodón húmedo o un pedazo

de papel filtro húmedo por 5 minutos, para permitir la sedimentación de plaquetas.

4. Finalmente, el recuento se realiza mediante un microscopio óptico de campo claro, a 40X, el condensador totalmente abajo, el diafragma semicerrado o casi cerrado por completo y en la zona de recuento de hematíes (cuadrante secundario central), con excepción del cuadrante terciario central (solo 4 cuadrantes, superior izquierda y derecha; inferior derecha e izquierda). Las plaquetas se pueden diferenciar de otros elementos debido a su color azul, refringencia y forma circular u oval (**anexo 7**). El número de plaquetas total contadas se multiplicó por 2875, dando como resultado el número de plaquetas/uL de sangre.

Notas:

- Si se cuentan menos de 50 plaquetas en total, se debe modificar el método con el uso de las siguientes proporciones: por cada 20 uL de sangre, agregar 425 uL de oxalato de amonio al 1% y 15 uL de Azul de Metileno de "HAMA" en sus pasos respectivos. El número de plaquetas total contadas se debe multiplicar por 1437, dando como resultado el número de plaquetas/uL de sangre.
- Si se cuentan más de 200 plaquetas en total, se debe modificar el método con el uso de las siguientes proporciones: por cada 20 uL de sangre, agregar 1760 uL de oxalato de amonio al 1% y 60 uL de Azul de metileno de "HAMA" en sus pasos respectivos. Todos los demás pasos se mantienen sin ninguna variante. El número de plaquetas total contadas se debe multiplicar por 5750, dando como resultado el número de plaquetas/uL de sangre.

Para contribuir con una mejor estandarización del procedimiento y así disminuir el sesgo, se generó un procedimiento operativo estandarizado.

Anexo 8

D. Recuento indirecto de plaquetas mediante el frotis sanguíneo: Estimación del recuento plaquetario con base en la razón de plaquetas/glóbulos rojos (Red Blood Cells/Platelet Ratio)

Este recuento fue realizado a partir de las indicaciones descritas en el trabajo de investigación denominado “Estimation of the Platelet count basis on Red Blood Cells/Platelet ratio”.¹⁷

Para más especificaciones propias del procedimiento mediante esta metodología, ver **anexo 9**.

3.7. Análisis de datos

3.7.1. Procesamiento de datos

A. Registro y tabulación

Los resultados obtenidos, tanto por el recuento óptico de plaquetas, recuento directo “original” de plaquetas y recuento indirecto de plaquetas fueron registrados directamente en el programa EXCEL del sistema operativo Windows XP.

Los resultados obtenidos por el recuento directo “modificado” de plaquetas fueron registrados manualmente en fichas de recolección de datos diseñadas para este trabajo de investigación y luego, llevados al programa EXCEL del sistema operativo Windows XP.

B. Análisis de datos

B.1. Establecimiento de los rangos de recuento y cálculo de la media aritmética, desviación estándar y mediana

El análisis de datos empezó con la aplicación de estadística descriptiva como lo son, el cálculo de la media aritmética, desviación estándar y mediana de los datos recolectados.

B.2. Cálculo de los coeficientes de variación (CV) interobservadores

Después se realizó un recuento de 20 muestras por el método “modificado”, en paralelo, por los dos tecnólogos médicos para poder calcular el rango de los coeficientes de variación interobservadores.

B.3. Aplicación de Test de normalidad o Contraste de normalidad

Se realizó con el fin de evaluar la distribución de valores y comprobar si se verifica o rechaza la hipótesis nula de que las muestras provienen de una población con distribución de probabilidad normal. Se aplicó el Test de Kolmogorov-Smirnov (K-S) y el Test de Shapiro-Wilk (S-W).

B.4. Aplicación de estadística NO PARAMÉTRICA

Debido a que se comprobó que 3 grupos (recuento “automatizado”, “original” y “modificado”) rechazaron la hipótesis nula de distribución normal, para un nivel de significancia ≤ 0.05 , se procedió a realizar la estadística NO PARAMÉTRICA para realizar comparaciones entre todos los grupos. Se aplicó el Test de Friedman seguido del Test *post-hoc* de Dunn.

B.5. Determinación del coeficiente de correlación de Spearman, para un nivel de significancia $p \leq 0.05$

Para su determinación, se usó los valores obtenidos en cada uno de los métodos de recuento (PLTO, RDMP, RDOP y RILP), con la finalidad de saber la fuerza de asociación entre los diferentes métodos.

B.6. Análisis de regresión lineal

Se procedió a realizar el análisis de regresión lineal con la finalidad de graficar un modelo de relación entre las variables y utilizar una de ellas para explicar la otra. Para ello se tomó como referencia a los recuentos óptico de plaquetas (variable X) debido a que conserva una buena correlación con el método actual de referencia (método inmunoplaquetas). Los recuentos de plaquetas “RDMP”, “RDOP” y “RILP” serán la variable Y para representar, cada uno, la ecuación de regresión con el método de referencia en este estudio “PLTO”.

$$Y = aX + b$$

Donde a y b representan a la pendiente de la recta corregida y el intercepto, respectivamente.

B.7. Test de Bland-Altman (análisis de diferencias individuales)

Esta prueba determinará la concordancia entre los métodos “RDOP”, “RDMP”, “RILP” con el método “PLTO”. Este Test gráfico está basado en el análisis de las diferencias individuales, que permite determinar los límites de concordancia y visualizar de forma gráfica las discrepancias observadas, con la

finalidad de saber hasta qué punto, los resultados obtenidos mediante las diferentes metodologías son equivalentes.

B.8. Determinación del desempeño de calidad en los niveles 1, 2 y 3 para las metodologías RDOP, RDMP y RILP

Se realizaron 20 mediciones mediante las metodologías “RDOP”, “RDMP” y “RILP” en cada uno de los niveles 1, 2 y 3 (bajo, normal y alto, respectivamente) a partir de controles internos donados por un representante de la casa comercial Sistemas Analíticos; empresa autorizada para proveer de equipos Abbott en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé. Luego, se halló la media aritmética, desviación estándar (DS) y coeficiente de variación (CV) y a partir de estos, el sesgo y error total de las mediciones. Posteriormente, se compararon los resultados con información interlaboratorial del mismo lote brindada por el mismo proveedor y un requisito de la calidad para el recuento de plaquetas dado por CLIA.

El cálculo del sesgo y el error total se hizo de la siguiente forma:

$$\text{Sesgo} = (\text{Media del método de recuento utilizado} - \text{Media de los laboratorios}) / \text{Media de los laboratorios}$$

$$\text{Error total} = 2 * \text{CV (del método de recuento utilizado)} + \text{V.A. Sesgo}$$

*: multiplicación. CV: coeficiente de variación. V.A. Sesgo: valor absoluto del sesgo.

B.9. Cálculo de indicadores de desempeño

Junto con el hallazgo del desempeño de calidad, se realizó el cálculo del índice de error total (IET), el coeficiente de variación relativo (CVR) y el sesgo relativo (SR) para contribuir y reforzar el concepto de significancia clínica con el impacto que se puede generar a partir de los resultados que provee el laboratorio clínico. Su determinación se realizó de la siguiente manera:

$$\text{IET} = \text{ET}/\text{RQ}$$

$$\text{CVR} = \text{CV}/(\text{RQ}/3)$$

$$\text{SR} = \text{V.A.Sesgo}/(\text{RQ}/4)$$

IET: índice de error total. CVR: coeficiente de variación relativo. SR: Sesgo relativo. ET: error total. RQ: requisito de la calidad. V.A.Sesgo: valor absoluto del sesgo.

3.8. Consideraciones éticas

3.8.1. Aprobación para la realización del presente trabajo de investigación por parte de la jefatura del servicio de Patología Clínica

Los laboratorios de hematología y emergencias del Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé, se encuentran formando parte del servicio de patología clínica. **Anexo 10**

3.8.2. Aprobación para la realización del presente trabajo de investigación por parte de la oficina de Docencia e Investigación

Se recibió la aprobación por parte del comité de ética institucional e investigación de esta oficina que pertenece al hospital en referencia. **Anexo 11**

IV. RESULTADOS

Se recolectaron 59 muestras, de las cuales se excluyeron 2 muestras por presentar “outliers” o valores atípicos extremos, que para el caso del recuento indirecto de plaquetas mediante lámina periférica fueron valores imposibles de calcular; un caso fue de pseudotrombocitopenia inducida por EDTA y el otro fue de trombocitosis (1 millón de plaquetas/uL). Finalmente, se consideraron sólo 57 muestras para poder realizar comparaciones sustentables entre los 4 métodos. De este número final de muestras, 11 casos (19%) fueron trombocitopenias, 6 casos (10%) fueron trombocitosis y 40 casos (71%) fueron recuentos normales ($150-450 \times 10^3$ plaquetas/uL). Los resultados fueron los siguientes:

4.1. Morfología, refringencia y coloración plaquetaria - método “RDMP”

Mediante la ficha de recolección de datos, que fue hecha para el método de recuento RDMP, se obtuvo lo siguiente: en el 100% de las observaciones, las plaquetas se mostraron azules (**Figuras 1, 2, 3 y 4**), refringentes (**Figuras 5, 6, 7 y 8**) y el valor numérico fue comparado con los otros métodos de recuento.

Durante la visualización, también se observaron algunos leucocitos y macroplaquetas, estos se diferenciaron por su morfología; y un fondo con muy pocos hematíes, estos se distinguieron por su morfología, poca o nula tanto refringencia como coloración.

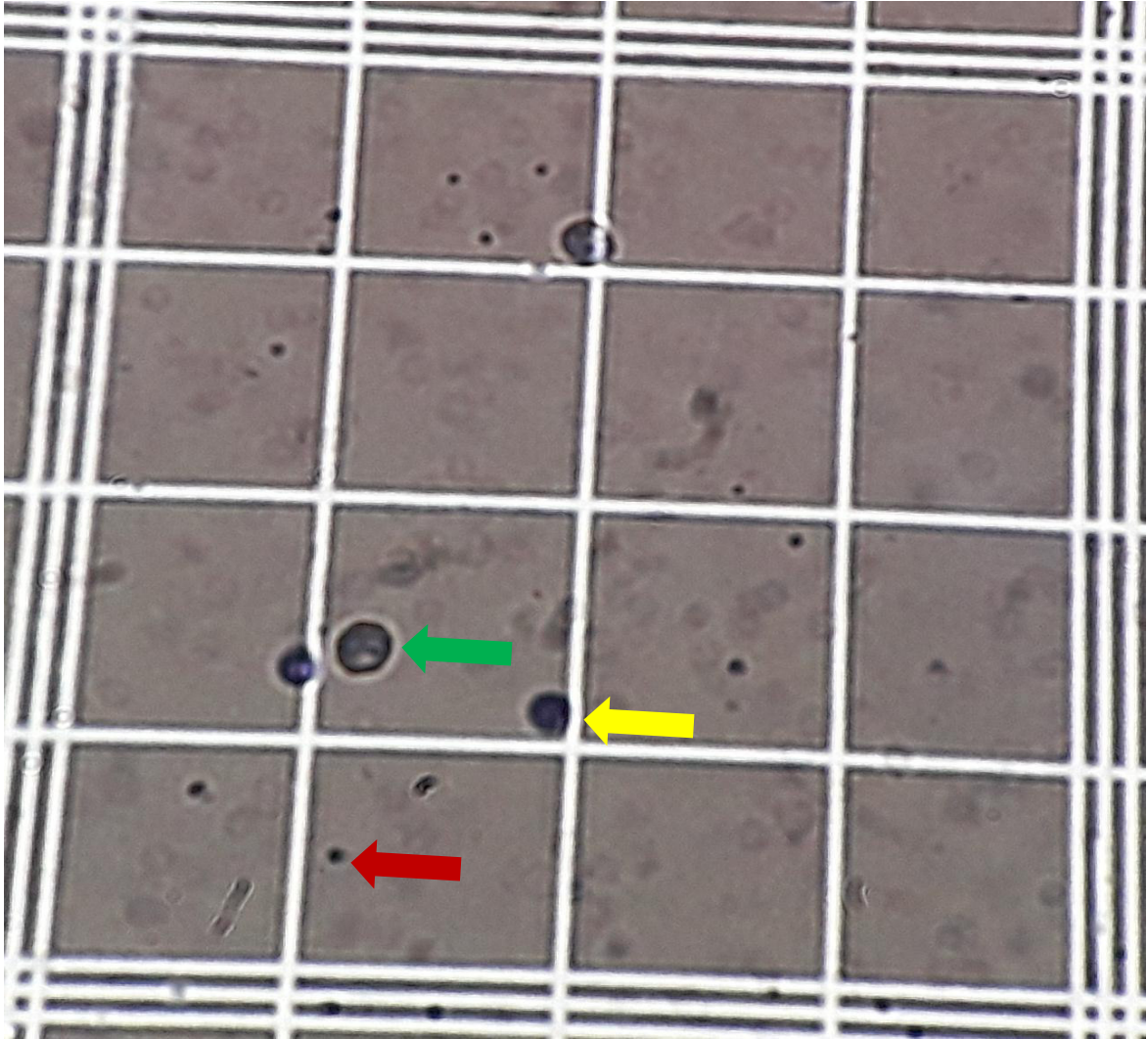


Figura 1. Coloración plaquetaria visualizada a 40X en el cuadrante superior izquierdo de la zona de recuento de plaquetas según el método "RDMP". Flecha verde: leucocito. Flecha amarilla: macroplaqueta. Flecha roja: plaqueta.

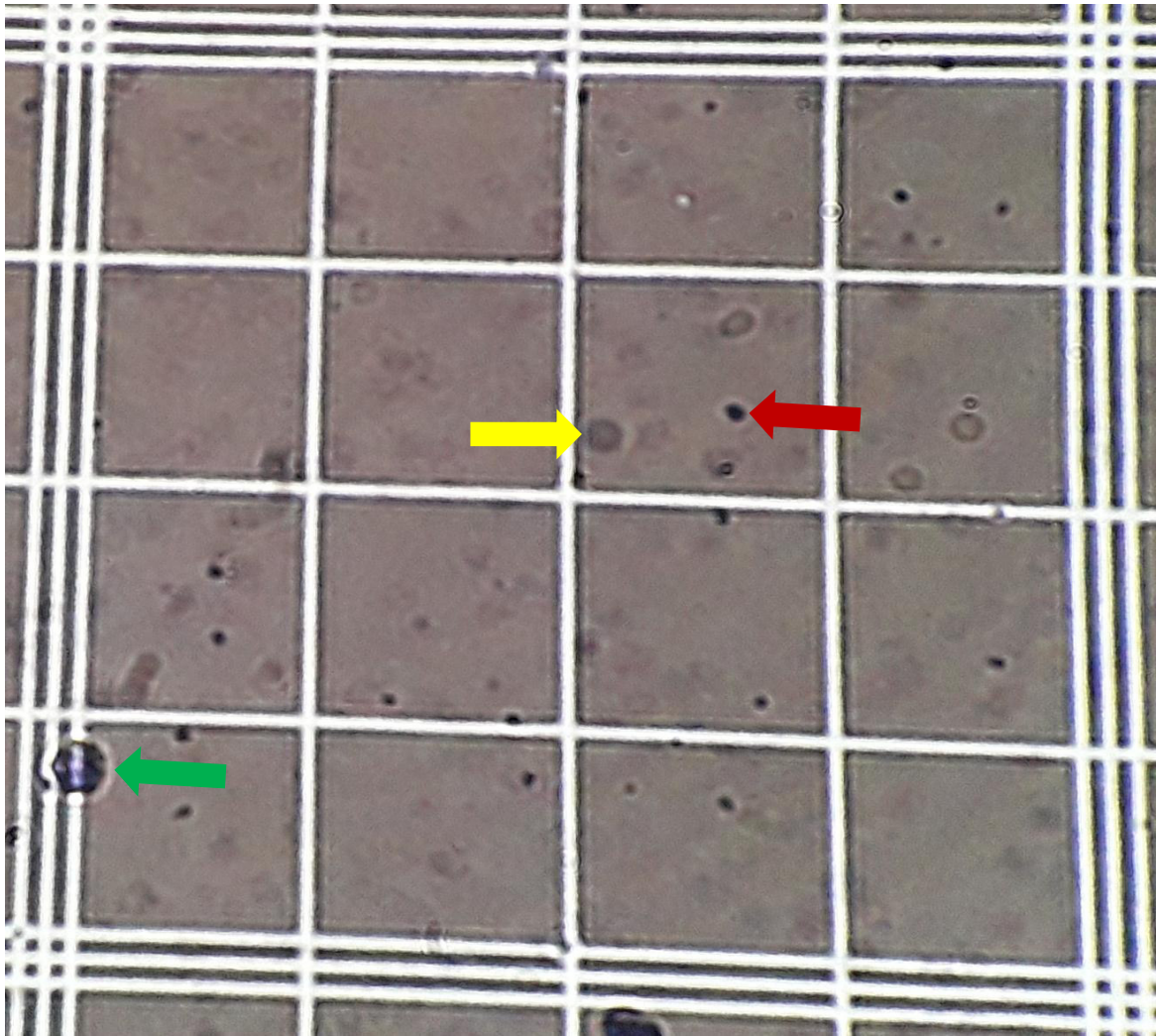


Figura 2. Coloración plaquetaria visualizada a 40X en el cuadrante superior derecho de la zona de recuento de plaquetas según el método “RDMP”. Flecha verde: leucocito. Flecha amarilla: hematíe. Flecha roja: plaqueta.

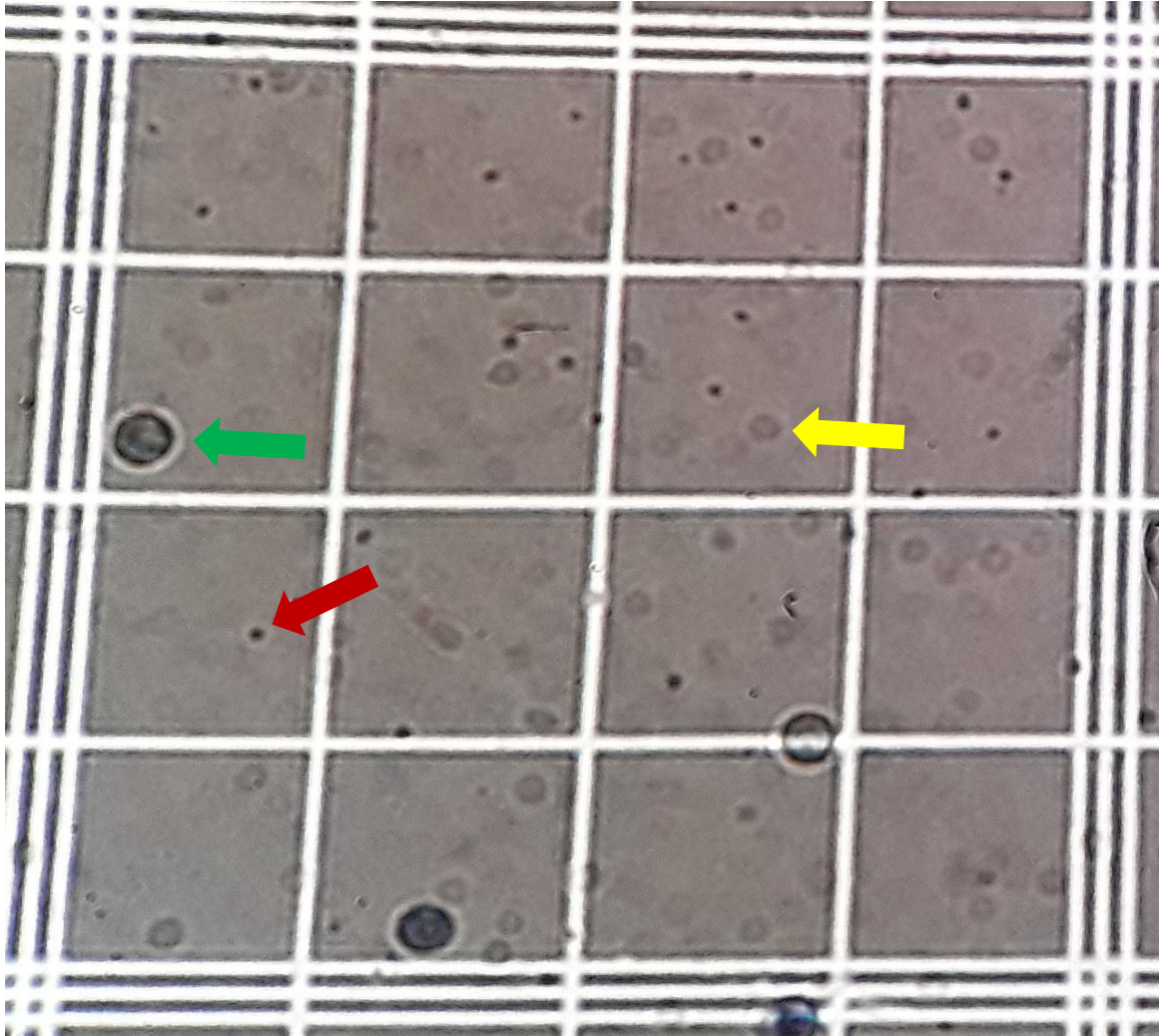


Figura 3. Coloración plaquetaria visualizada a 40X en el cuadrante inferior derecho de la zona de recuento de plaquetas según el método “RDMP”. Flecha verde: leucocito. Flecha amarilla: hematíe. Flecha roja: plaqueta.

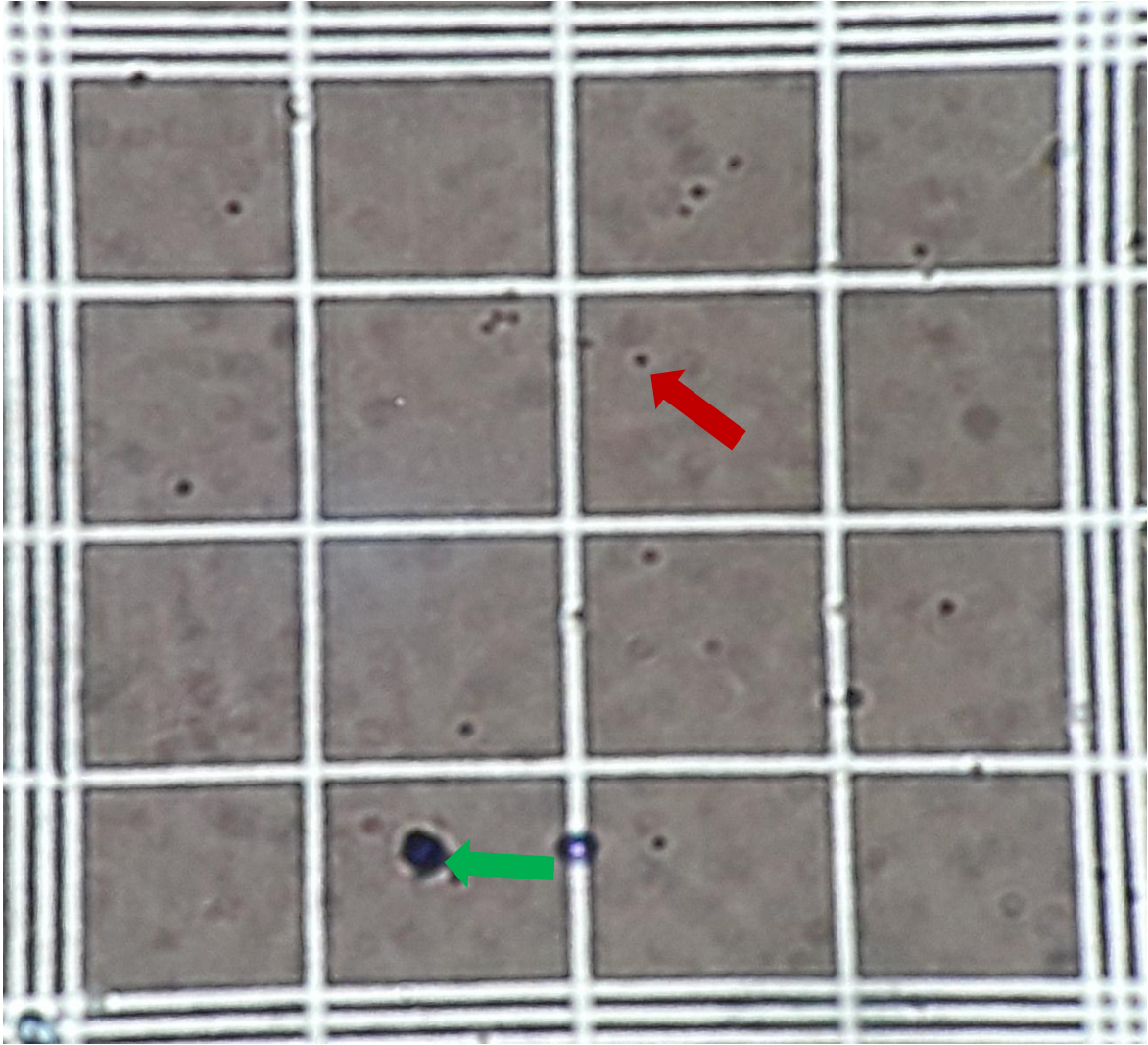


Figura 4. Coloración plaquetaria visualizada a 40X en el cuadrante inferior izquierdo de la zona de recuento de plaquetas según el método “RDMP”. Flecha verde: leucocito. Flecha roja: plaqueta.

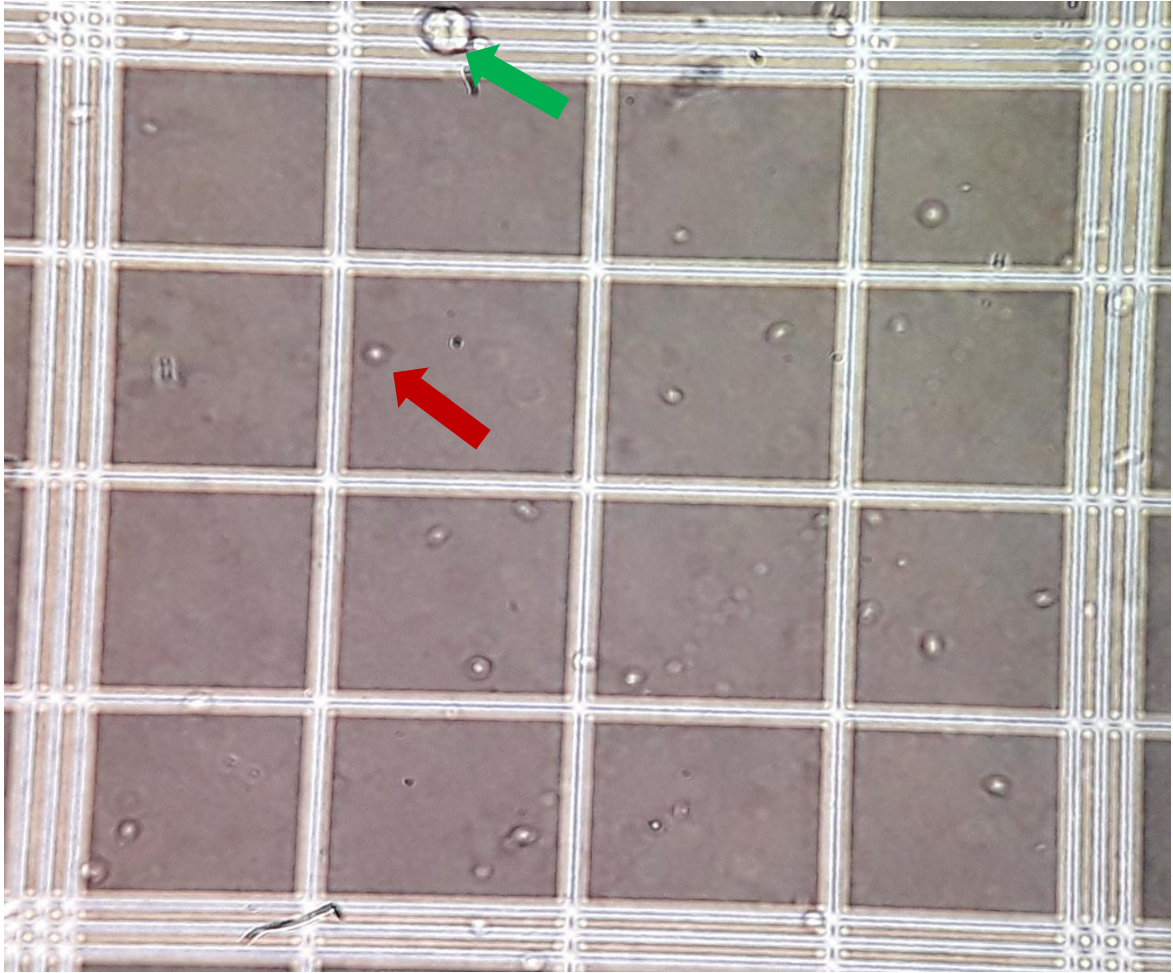


Figura 5. Refringencia plaquetaria visualizada a 40X en el cuadrante superior izquierdo de la zona de recuento de plaquetas según el método “RDMP”. Flecha verde: leucocito. Flecha roja: plaqueta.

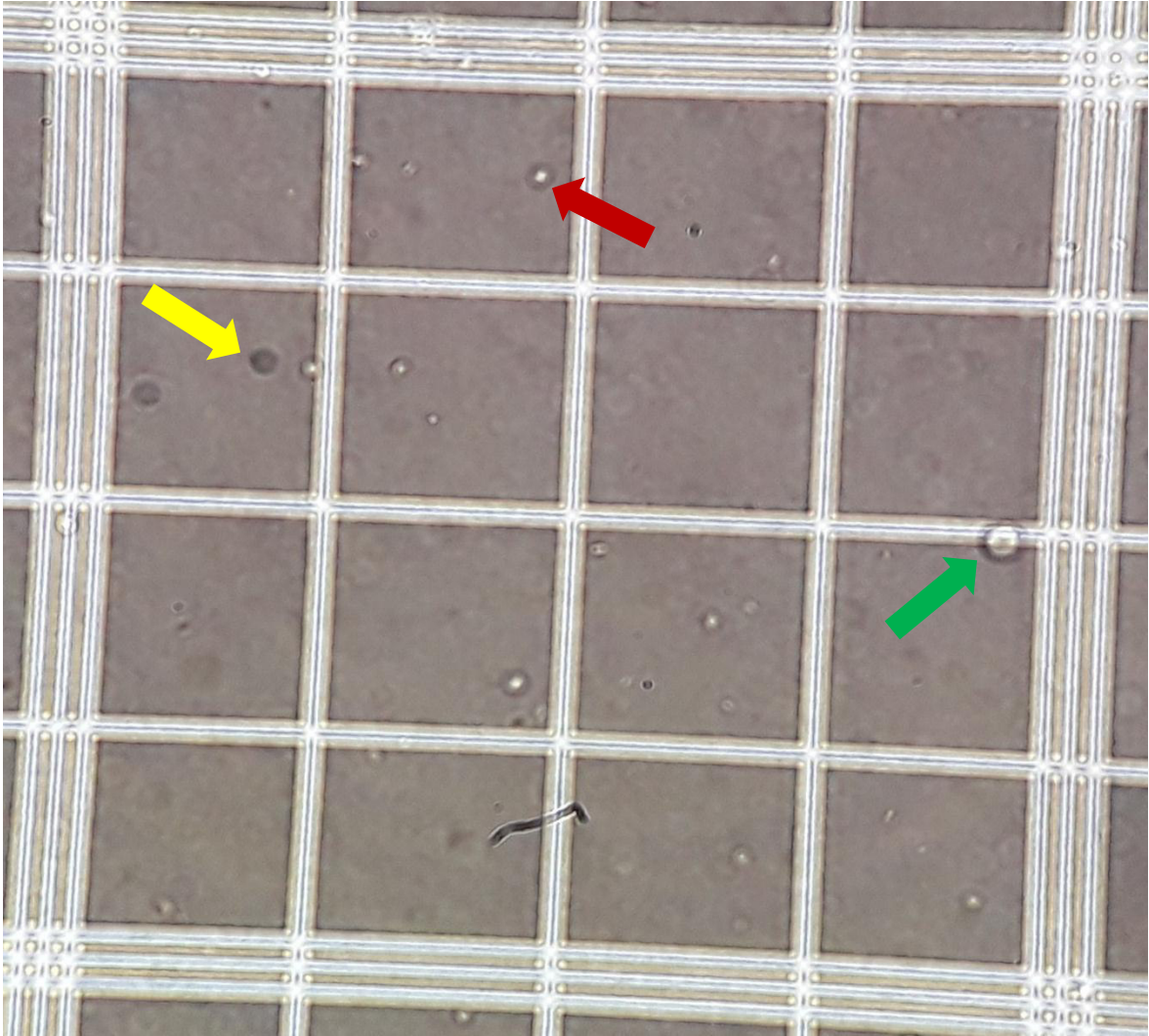


Figura 6. Refringencia plaquetaria visualizada a 40X en el cuadrante superior derecho de la zona de recuento de plaquetas según el método "RDMP". Flecha verde: leucocito. Flecha amarilla: hematíe. Flecha roja: plaqueta.

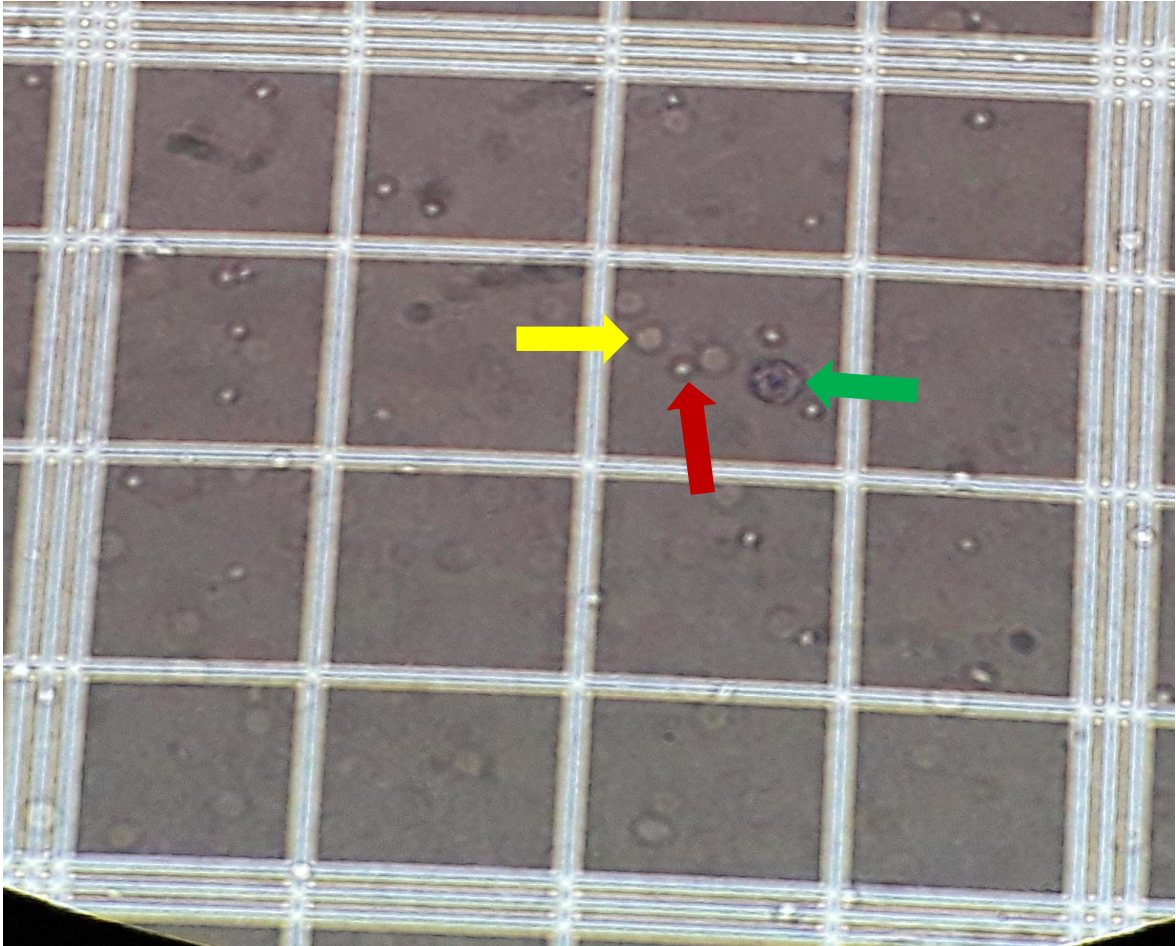


Figura 7. Refringencia plaquetaria visualizada a 40X en el cuadrante inferior derecho de la zona de recuento de plaquetas según el método “RDMP”. Flecha verde: leucocito. Flecha amarilla: hematíe. Flecha roja: plaqueta.

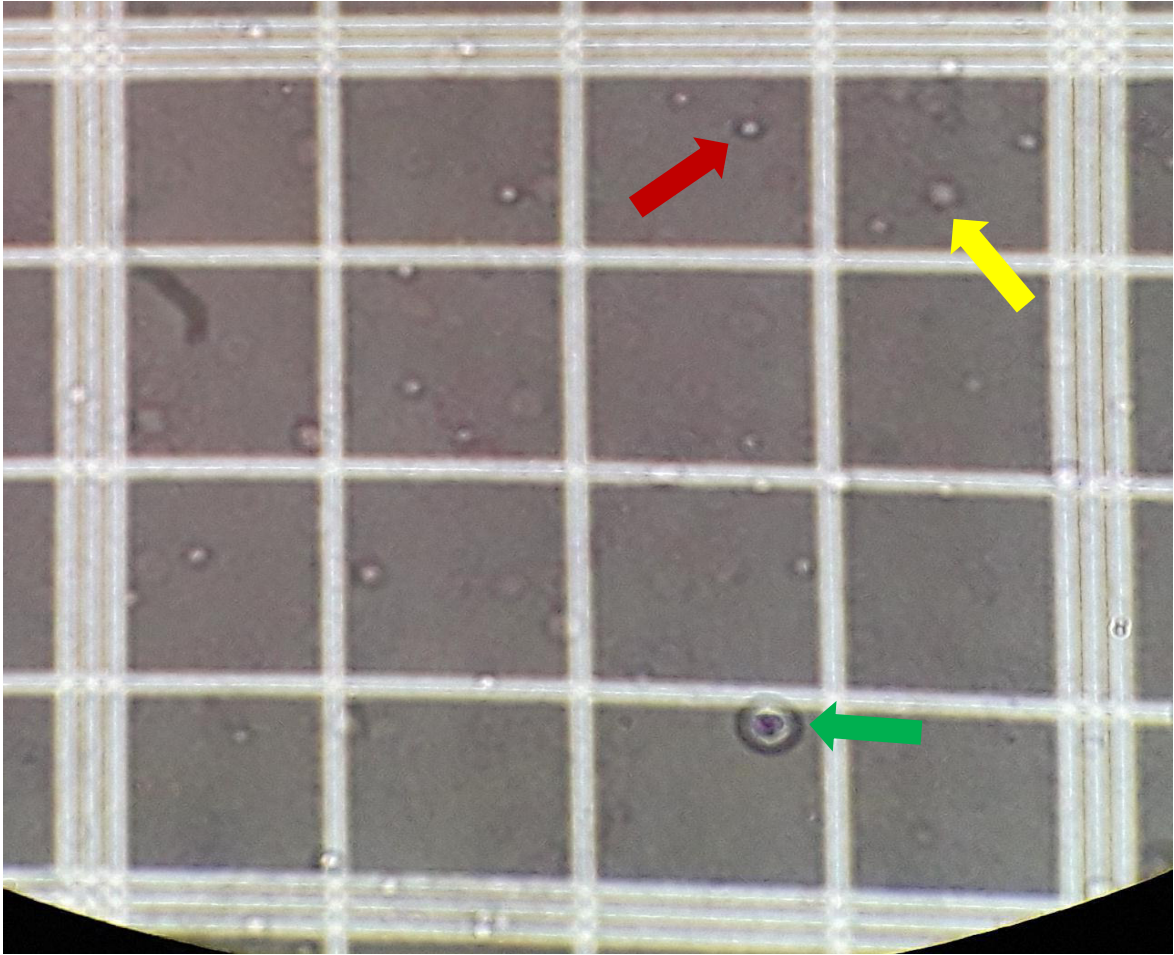


Figura 8. Refringencia plaquetaria visualizada a 40X en el cuadrante inferior izquierdo de la zona de recuento de plaquetas según el método "RDMP". Flecha verde: leucocito. Flecha amarilla: hematíe. Flecha roja: plaqueta.

4.2. Establecimiento de los rangos de recuento, cálculo de la media aritmética \pm desviación estándar y mediana

En el presente trabajo de investigación, el método que mostró una mayor dispersión de datos con respecto a su media, fue el “RILP”, siendo por lo tanto, el que menor precisión tuvo con respecto a los demás métodos (**Tabla 1**). Las medianas estuvieron muy cercanas a sus medias, lo que indica que no hubo valores muy atípicos que pudieran afectar el valor numérico real que separa la mitad superior de los recuentos, de la mitad inferior. (**Gráfico 1**)

Tabla 1. Establecimiento de los rangos de recuento, media aritmética \pm desviación estándar y mediana

	AUTOMATIZADO “PLTO” ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	“ORIGINAL” ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	“MODIFICADO” ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	“LÁMINA PÉRIFÉRICA” ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
RANGO	41 - 640	37.5 - 550	43 - 690	72 - 756
MEDIA \pm DS	267.47 \pm 141.76	222.81 \pm 121.52	267.45 \pm 140.60	347.30 \pm 159.07
MEDIANA	261	215	261.63	338

AUTOMATIZADO “PLTO”: recuento óptico de plaquetas. “ORIGINAL”: recuento directo original de plaquetas “RDOP”. “MODIFICADO”: recuento directo modificado de plaquetas “RDMP”. “LÁMINA PERIFÉRICA”: recuento indirecto mediante lámina periférica “RILP”.

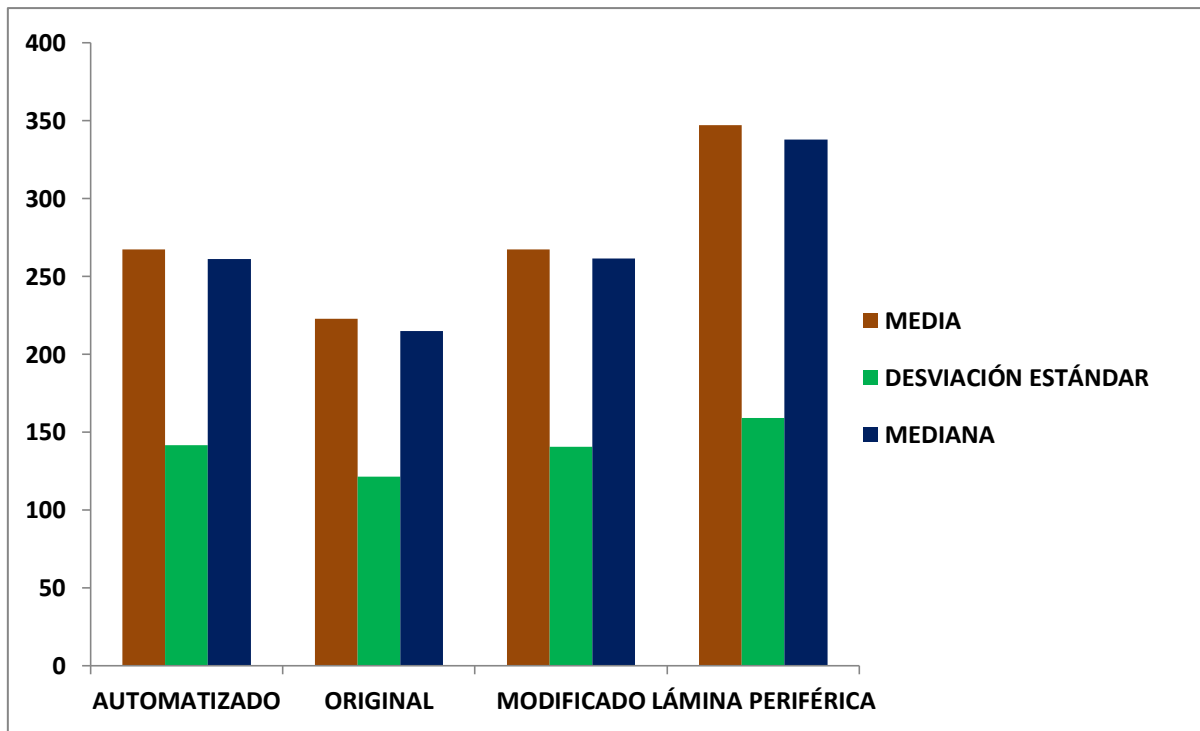


Gráfico 1. Comparación de la media aritmética, desviación estándar y mediana para los métodos de recuento de plaquetas utilizados. El método automatizado y el modificado mostraron medidas de tendencia central y de dispersión similares.

4.3. Determinación de los coeficientes de variación interobservadores para el método RDMP

El presente estudio halló que el método “RDMP”, presentó coeficientes de variación interobservador que estuvieron entre los rangos de 5.1% - 7.2% (Gráfico 2 y Tabla 2).

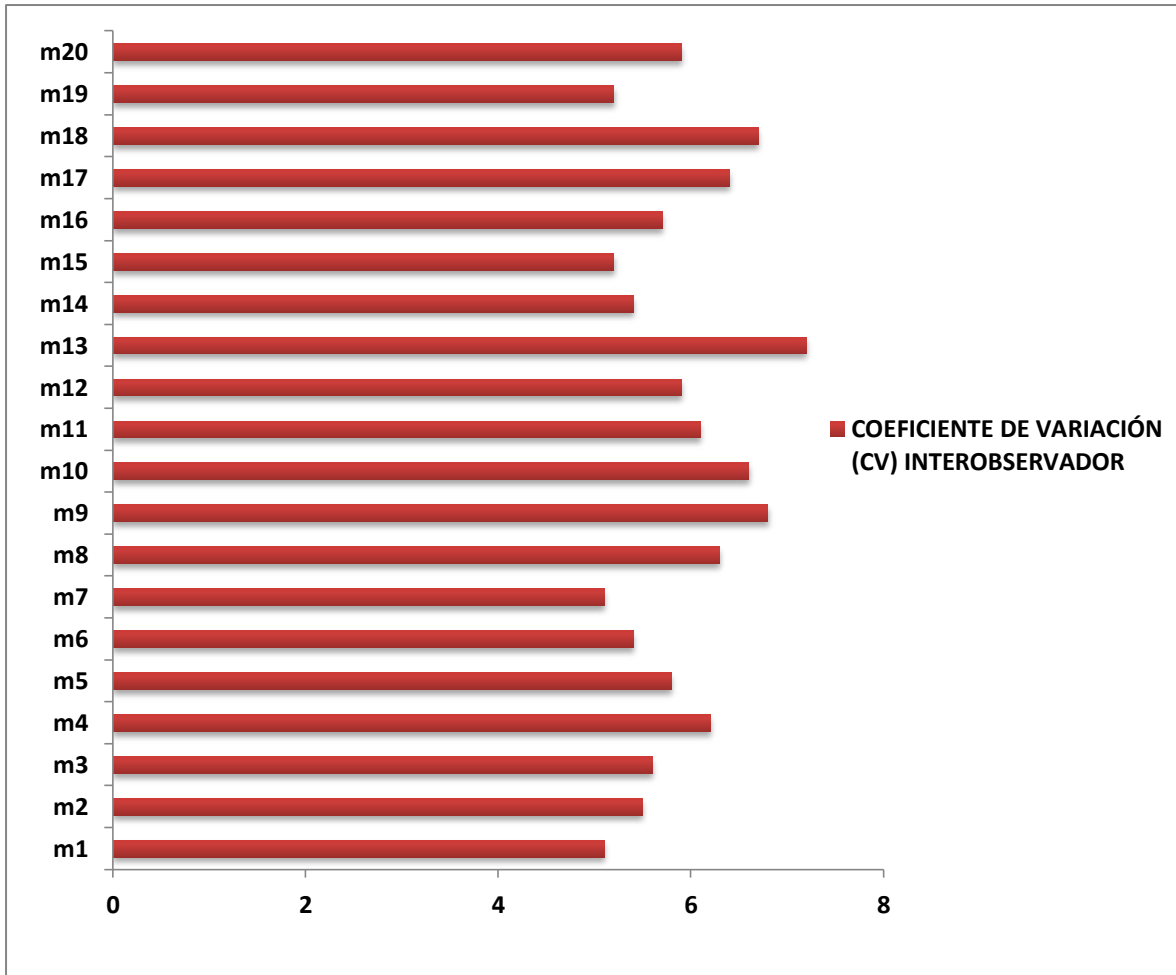


Gráfico 2. Comparación de los coeficientes de variación (CV) interobservadores del método “RDMP”. Estos tuvieron un rango entre 5.1% y 7.2%.

Tabla 2. Determinación de los coeficientes de variación interobservadores para el método RDMP

MUESTRA	COEFICIENTES DE VARIACIÓN INTEROBSERVADORES (%)
m₁	5.1
m₂	5.5
m₃	5.6
m₄	6.2
m₅	5.8
m₆	5.4
m₇	5.1
m₈	6.3
m₉	6.8
m₁₀	6.6
m₁₁	6.1
m₁₂	5.9
m₁₃	7.2
m₁₄	5.4
m₁₅	5.2
m₁₆	5.7
m₁₇	6.4
m₁₈	6.7
m₁₉	5.2
m₂₀	5.9

m_x: número de muestra

4.4. Aplicación de Test de normalidad o Contraste de normalidad

En este estudio, la aplicación de Test o contraste de normalidad se usó para comprobar si se verifica la hipótesis de normalidad necesaria para que ciertos análisis presenten fiabilidad estadística, como por ejemplo, para el análisis de varianzas (ANOVA) o el Test *post hoc* de Dunn. Con respecto a esa característica a evaluar, se utilizaron Kolmogorov-Smirnov (**Tabla 3**) y Shapiro-Wilk (**Tabla 4**). Estos mostraron el rechazo de la hipótesis de normalidad ($p \leq 0.05$) para los métodos de recuento “PLTO”, “RDOP” y “RDMP” y para su visualización fueron graficadas, para los 4 métodos empleados, histogramas de frecuencias y curvas de distribución. (**Gráficos 3, 4, 5 y 6**)

Tabla 3. Aplicación del Test de normalidad o contraste de normalidad Kolmogorov-Smirnov (K-S)

Test de normalidad K-S	AUTOMATIZADO “PLTO”	“ORIGINAL”	“MODIFICADO”	“LÁMINA PERIFÉRICA”
Distancia K-S	0.1341	0.1187	0.1209	0.09634
Valor “p”	0.0124	0.0442	0.0371	$p > 0.10$
Pasó el test de normalidad ($p < 0.05$)?	No	No	No	Yes

AUTOMATIZADO “PLTO”: recuento óptico de plaquetas. “ORIGINAL”: recuento directo original de plaquetas “RDOP”. “MODIFICADO”: recuento directo modificado de plaquetas “RDMP”. “LÁMINA PERIFÉRICA”: recuento indirecto mediante lámina periférica “RILP”.

Tabla 4. Aplicación del Test de normalidad o contraste de normalidad Shapiro-Wilk (S-W)

Test de normalidad S-W	AUTOMATIZADO "PLTO"	"ORIGINAL"	"MODIFICADO"	"LÁMINA PERIFÉRICA"
Distancia S-W	0.9281	0.9230	0.9507	0.9660
Valor "p"	0.0022	0.0014	0.0211	0.1085
Pasó el test de normalidad (p<0.05)?	No	No	No	Yes

AUTOMATIZADO "PLTO": recuento óptico de plaquetas. "ORIGINAL": recuento directo original de plaquetas "RDOP". "MODIFICADO": recuento directo modificado de plaquetas "RDMP". "LÁMINA PERIFÉRICA": recuento indirecto mediante lámina periférica "RILP".

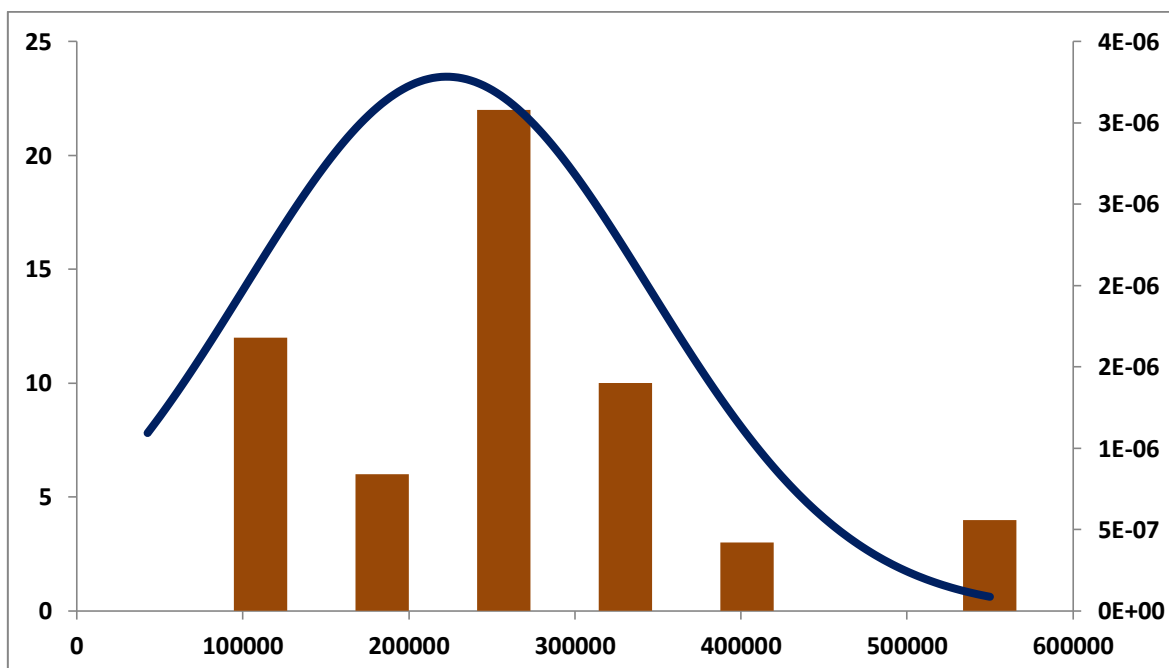


Gráfico 3. Histograma de frecuencias y curva de distribución del método "RDOP"

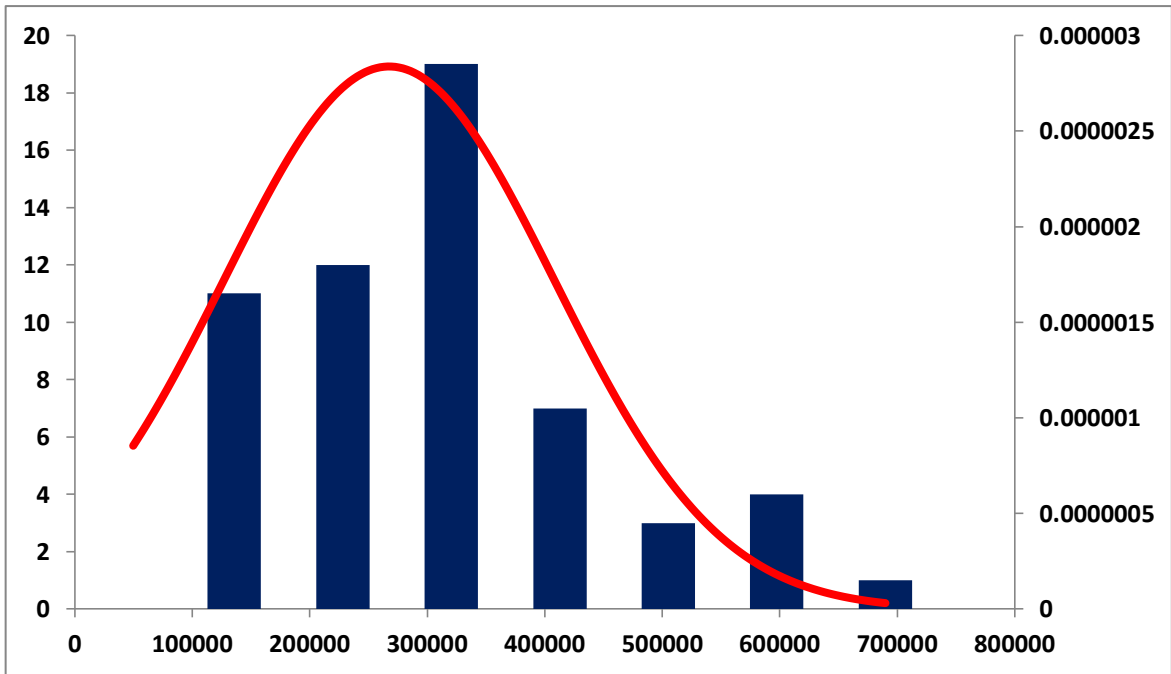


Gráfico 4. Histograma de frecuencias y curva de distribución del método "RDMP"

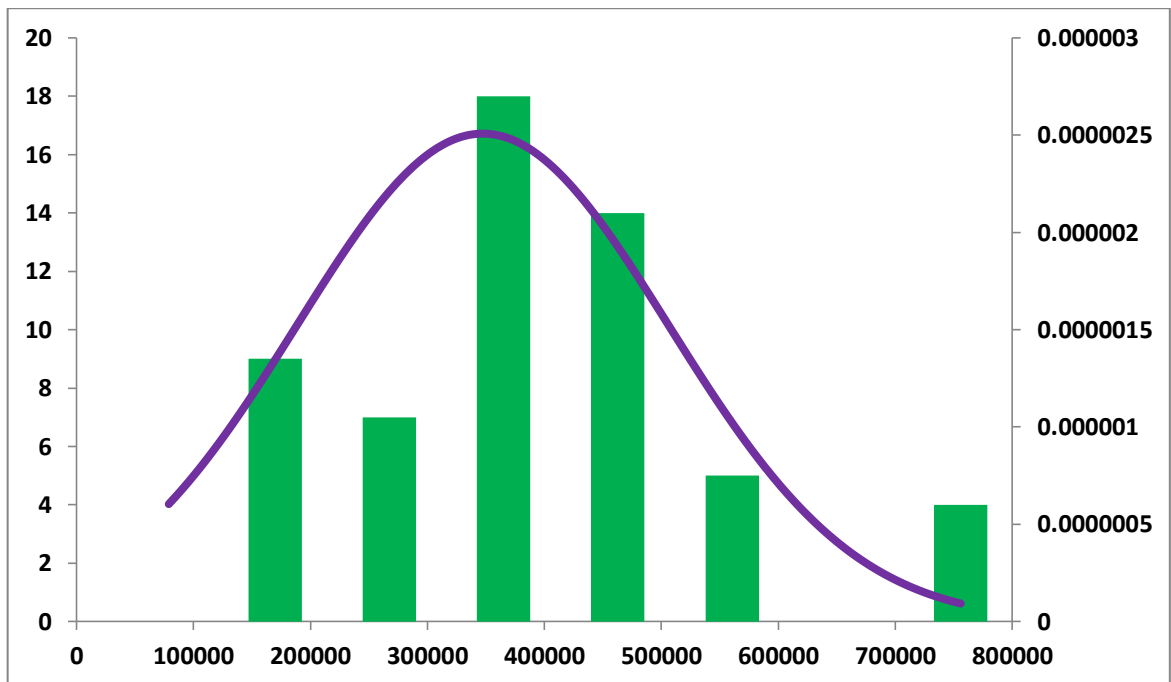


Gráfico 5. Histograma de frecuencias y curva de distribución del método "RILP"

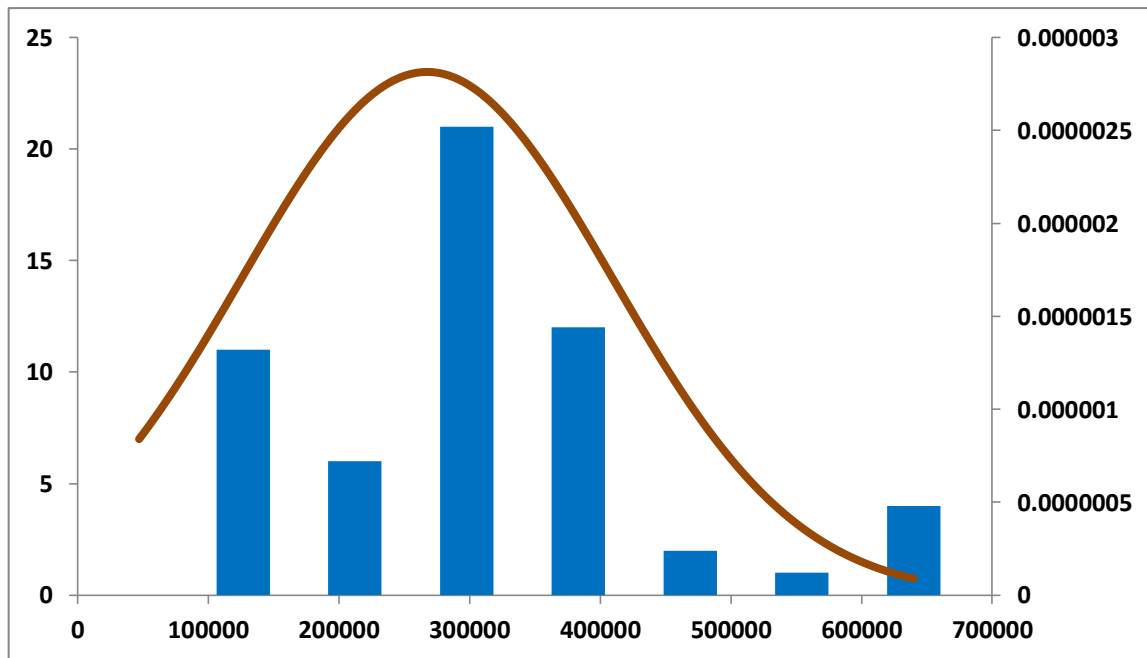


Gráfico 6. Histograma de frecuencias y curva de distribución del método "PLTO"

4.5. Aplicación de estadística NO PARÁMETRICA

Debido a que los valores reportados por 3 métodos rechazaron la hipótesis de normalidad, se procedió a realizar pruebas NO PARAMÉTRICAS para conocer si existen diferencias significativas entre todos métodos de recuento de plaquetas empleados. El test de Friedman demostró que existen pruebas suficientes para rechazar la hipótesis nula y concluir que existen diferencias significativas entre los 4 métodos. **(Tabla 5)**

Posteriormente, se procedió a identificar qué grupos específicamente son significativos con respecto a los demás y se realizó, entonces, la prueba de comparación múltiple de Dunn, ésta demostró que únicamente, no existen diferencias significativas entre el método de "RDMP" y el método de "PLTO" **(Tabla 6)**. Para su visualización, se procedió a graficar un diagrama "caja y bigotes". **(Gráfico 7)**

Tabla 5. Aplicación del Test de Friedman. Si el valor del estadístico de Friedman es mayor de 7.81, cuando se están comparando 4 grupos, demuestra que existen pruebas estadísticas suficientes para rechazar la hipótesis nula y concluir que existen diferencias significativas entre los grupos; su valor en este estudio fue de 152.6.

TEST DE FRIEDMAN	
Valor “p”	P<0.0001
Son las medianas significativamente diferentes? (p < 0.05)	Yes
Número de grupos	4
Estadístico de Friedman	152.6

Tabla 6. Aplicación del Test *post-hoc* de DUNN

PRUEBA DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE DUNN	Diferencia en la suma de rangos	Significativo? p < 0.05?
“AUTOMATIZADO” vs “ORIGINAL”	81.00	Yes
“AUTOMATIZADO” vs “MODIFICADO”	-10.00	No
“AUTOMATIZADO” vs “LÁMINA PERIFÉRICA”	-89.00	Yes
“ORIGINAL” vs “MODIFICADO”	-91.00	Yes
“ORIGINAL” vs “LÁMINA PERIFÉRICA”	-170.0	Yes
“MODIFICADO” vs “LÁMINA PERIFÉRICA”	-79.00	Yes

“AUTOMATIZADO”: recuento óptico de plaquetas (PLTO). “ORIGINAL”: recuento directo original de plaquetas “RDOP”. “MODIFICADO”: recuento directo modificado de plaquetas “RDMP”. “LÁMINA PERIFÉRICA”: recuento indirecto mediante lámina periférica “RILP”.

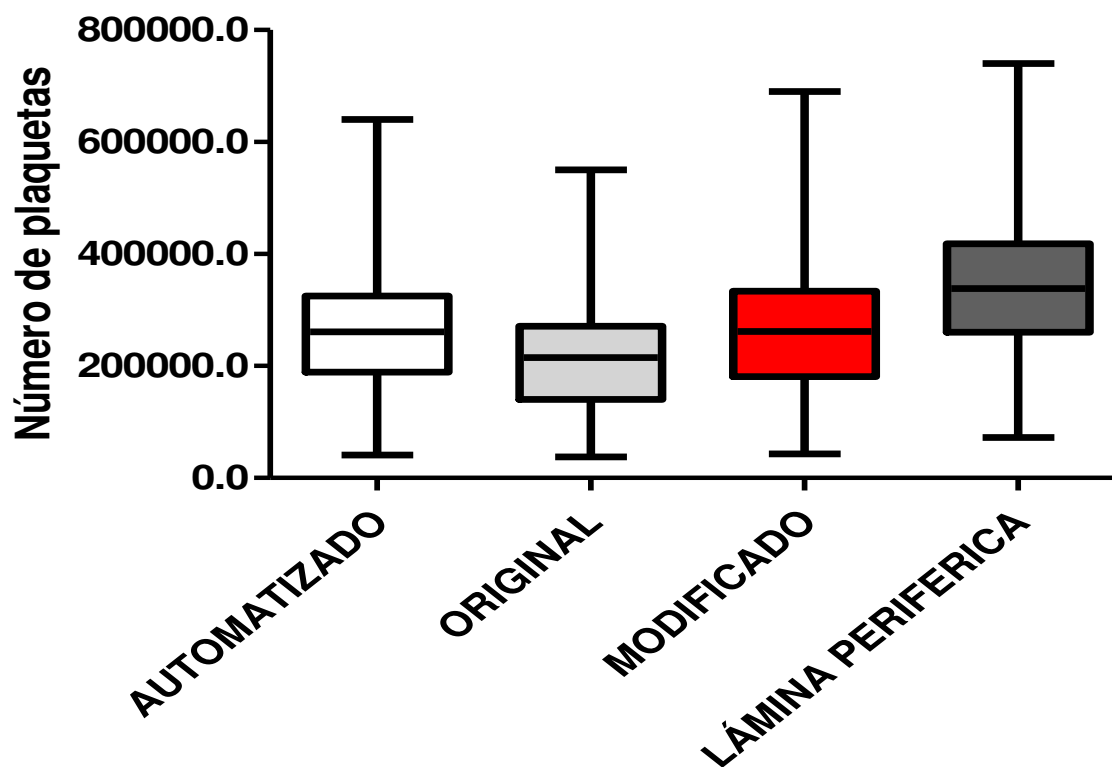


Gráfico 7. Diagrama “caja y bigotes” de los métodos PLTO, RDOP, RDMP y RILP. Se observó similar distribución de los datos recolectados por los métodos “AUTOMATIZADO” (PLTO) y el “MODIFICADO” (RDMP).

4.6. Determinación del coeficiente de correlación de Spearman

Para determinar la asociación entre las variables, se calculó el coeficiente de correlación de Spearman (**Tabla 7**), debido a que los datos no siguen una curva de distribución normal. Se demostró una correlación positiva entre los métodos “RDOP”, “RDMP” y “RILP” (0.998, 0.984 y 0.985, respectivamente). Adicionalmente, se graficó los diferentes valores del coeficiente de correlación de Spearman para los métodos de recuento que se compararon con el automatizado. (**Grafico 8**)

Tabla 7. Determinación del coeficiente de correlación de Spearman. Se considera una correlación positiva cuando se encuentra entre 0 y 1.

Coeficiente de correlación Spearman	“ORIGINAL”	“MODIFICADO”	“LÁMINA PERIFÉRICA”
“AUTOMATIZADO”	0.998	0.984	0.985

“AUTOMATIZADO”: recuento óptico de plaquetas (PLTO). “ORIGINAL”: recuento directo original de plaquetas “RDOP”. “MODIFICADO”: recuento directo modificado de plaquetas “RDMP”. “LÁMINA PERIFÉRICA”: recuento indirecto mediante lámina periférica “RILP”.

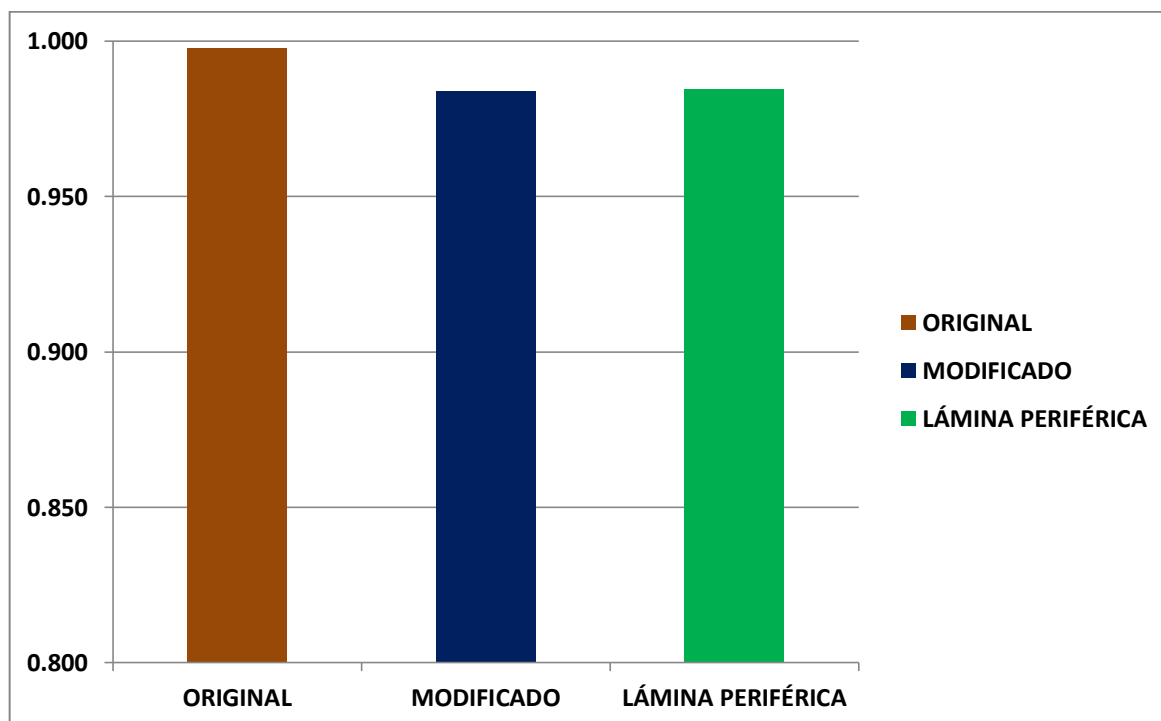


Gráfico 8. Comparación de los coeficientes de correlación de Spearman de los métodos “RDOP”, “RDMP” y “RILP” con el método de recuento “PLTO”. Todos los grupos tuvieron una correlación positiva y estuvieron muy cercanos entre sí.

4.7. Análisis de regresión lineal

La ecuación de regresión para el método RDOP fue $Y = 0.8552X - 5935$ con un $R^2 = 0.9952$, para el método RDMP fue $Y = 0.9758X - 6435$ con un $R^2 = 0.9680$ y para el método RILP fue $Y = 1.020X + 66070$ con un $R^2 = 0.9693$. Las pendientes en todos los casos evaluados tienen signo positivo por lo que la relación que existe es proporcional. Además, en el caso de las muestras evaluadas mediante el recuento “RDOP” se observó la pendiente (0.8552) más alejada de la unidad y con respecto a las muestras evaluadas mediante el recuento “RDMP”, se observó el menor coeficiente de determinación (R^2), que fue de 0.9680 (**Tabla 8**). Para mejorar la interpretación, se procedió a graficarlas. (**Gráficos 9, 11 y 13**)

Para el caso de los resultados de los residuos, para mejor la interpretación, se procedió a graficarlos (**Gráficos 10, 12 y 14**). Los que presentaron menor alejamiento de la media (0) fueron para los recuentos evaluados mediante el método “RDMP”. (**Gráfico 12**)

Tabla 8. Análisis de regresión lineal

VALORES DE MEJOR AJUSTE	“ORIGINAL”	“MODIFICADO”	“LÁMINA PERIFÉRICA”
Nº DE VALORES	108	108	108
PENDIENTE	0.8552	0.9758	1.020
INTERCEPTO	-5935	6435	66070
R^2	0.9952	0.9680	0.9693

Nº: Número. R^2 : coeficiente de determinación. “ORIGINAL”: recuento directo original de plaquetas “RDOP”. “MODIFICADO”: recuento directo modificado de plaquetas “RDMP”. “LÁMINA PERIFÉRICA”: recuento indirecto mediante lámina periférica “RILP”.

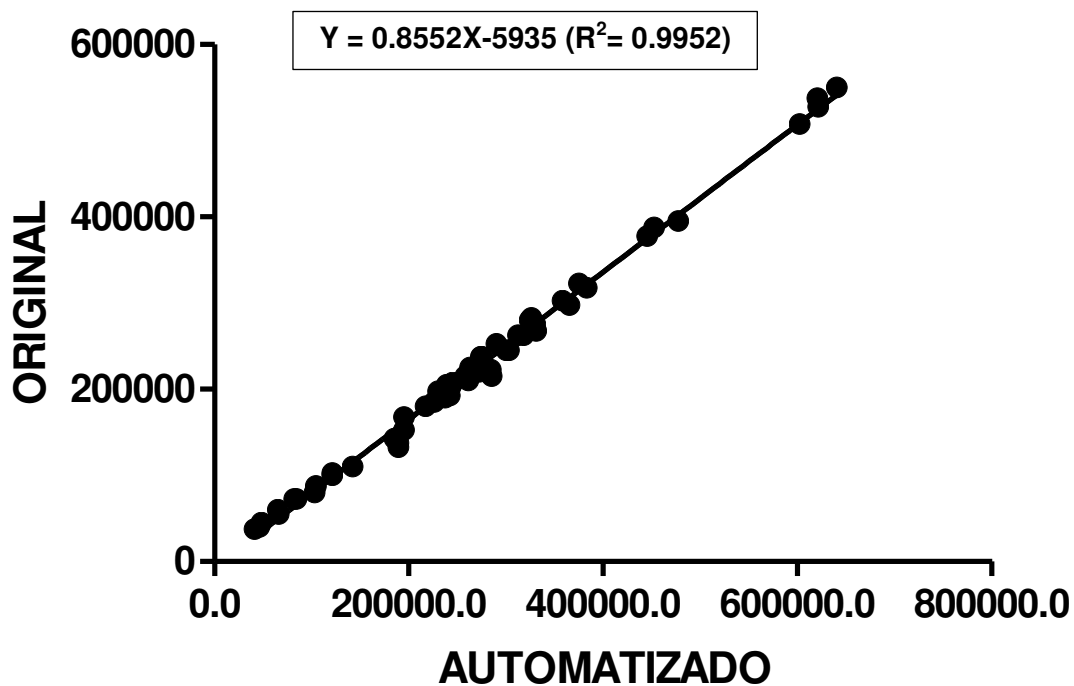


Gráfico 9. Análisis de regresión lineal del método “PLTO” en comparación con el método “RDOP”

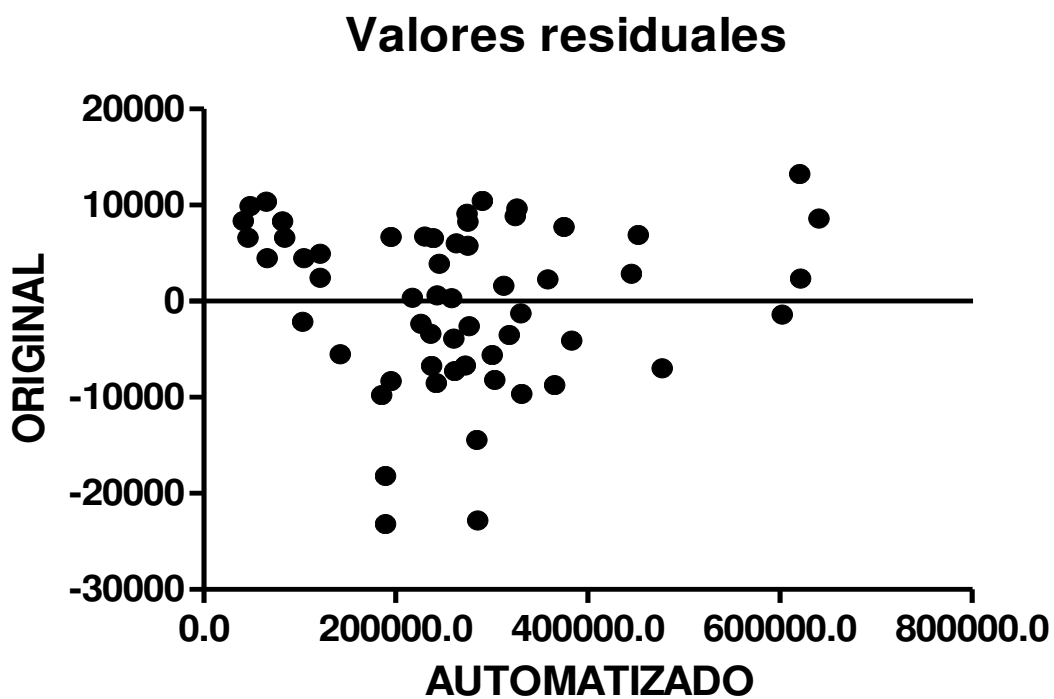


Gráfico 10. Valores residuales del método “PLTO” en comparación con el método “RDOP”

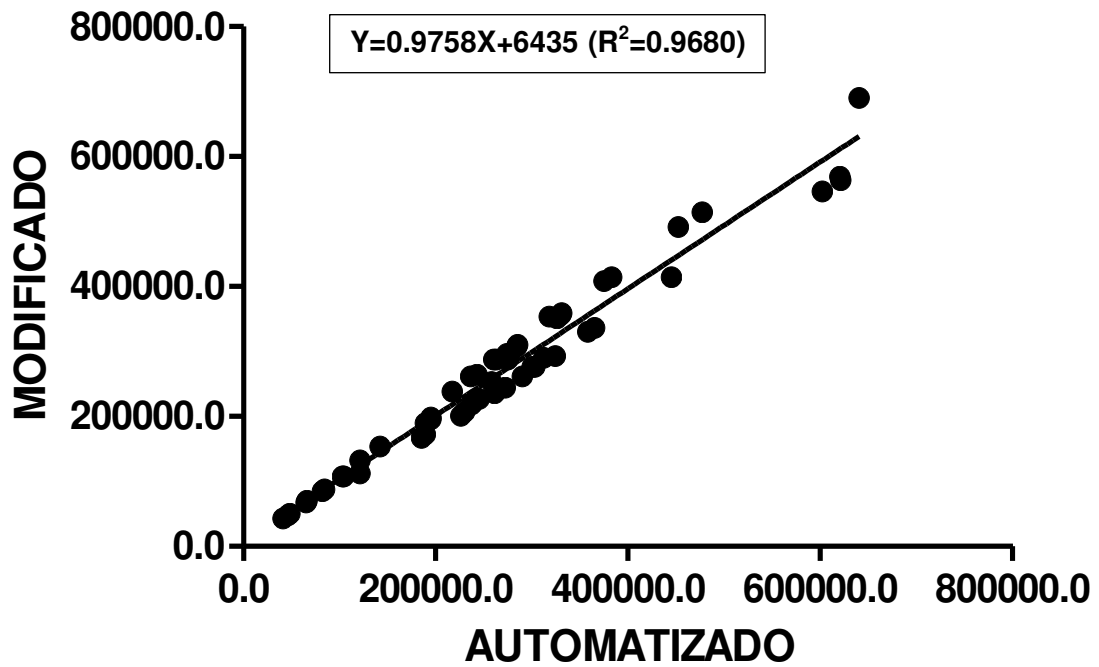


Gráfico 11. Análisis de regresión lineal del método “PLTO” en comparación con el método “RDMP”

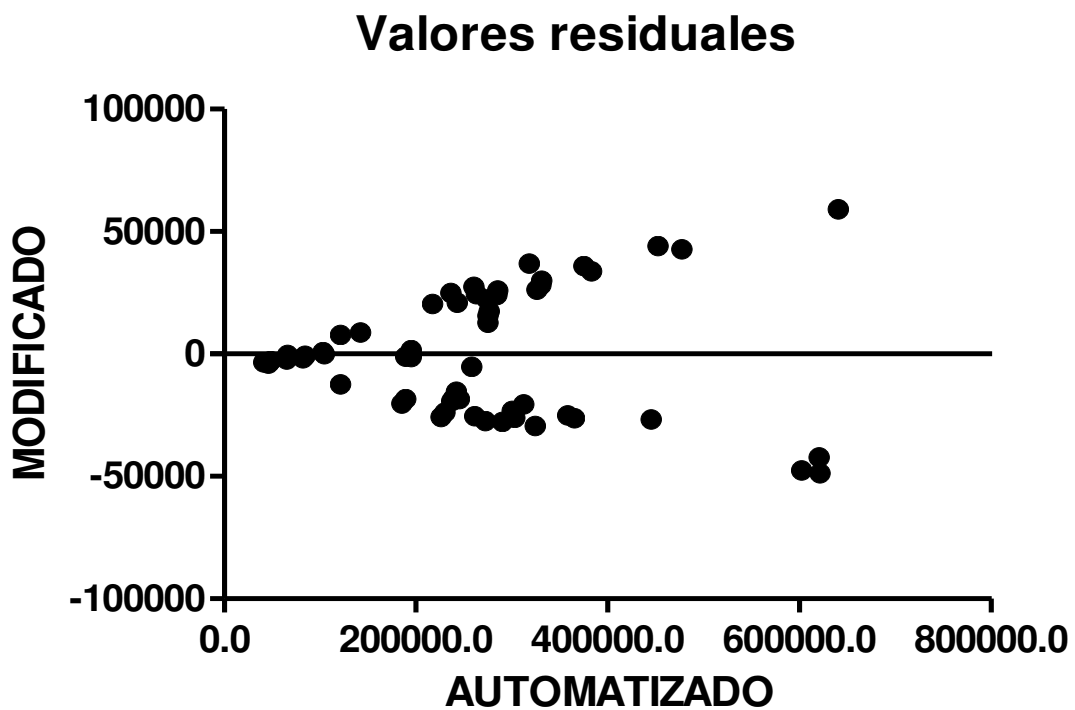


Gráfico 12. Valores residuales del método “PLTO” en comparación con el método “RDMP”

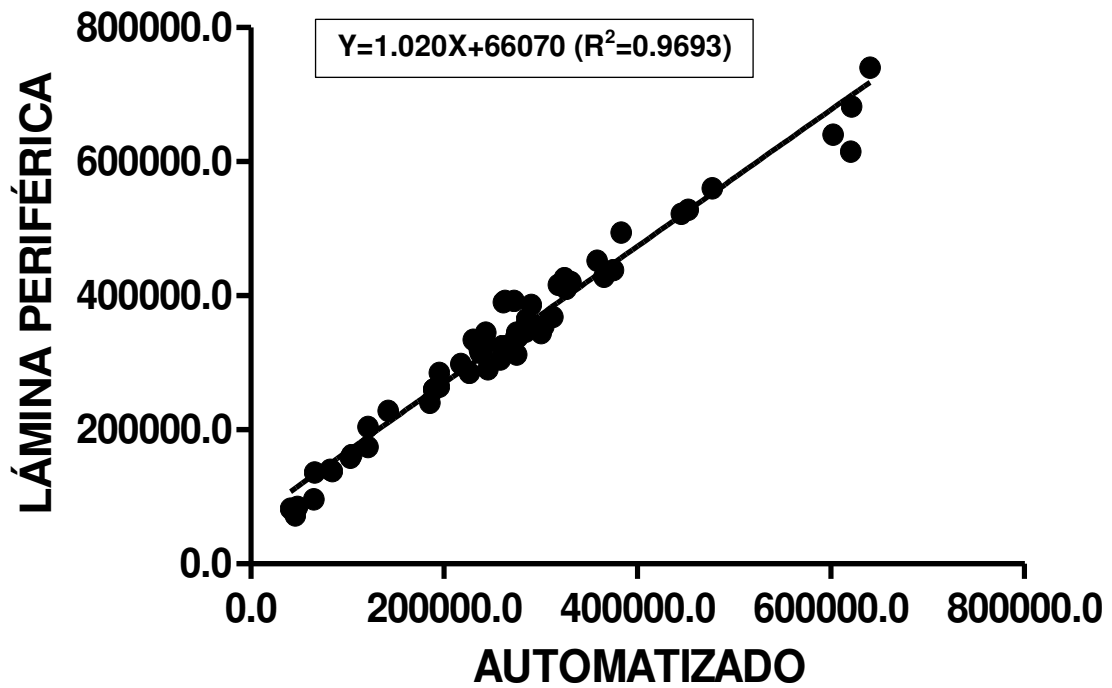


Gráfico 13. Análisis de regresión lineal del método “PLTO” en comparación con el método “RILP”

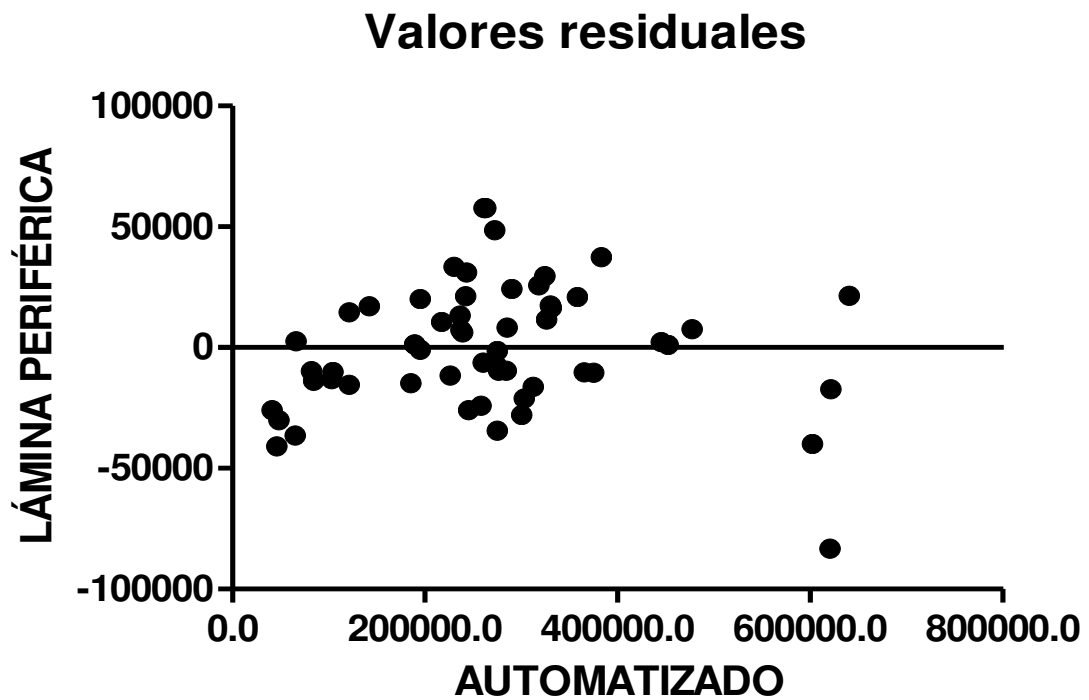


Gráfico 14. Valores residuales del método “PLTO” en comparación con el método “RILP”

4.8. Aplicación del Test de Bland - Altman

Esta prueba está basada en el análisis de las diferencias individuales y permite determinar los límites de concordancia y visualizar de forma gráfica las discrepancias observadas, con la finalidad de saber hasta qué punto los resultados obtenidos mediante las diferentes metodologías son equivalentes. Los **gráficos 15, 16 y 17** muestran que la mayoría de diferencias se ubican alrededor del BIAS (44666.7 plaquetas/uL, 27.8421 plaquetas/uL y -71333.4 plaquetas/uL respectivamente) y que el método “RDMP” tuvo el menor BIAS. (**Tabla 9**)

Adicionalmente, para el caso del **gráfico 15**, las diferencias entre las mediciones (línea negra continua) se encuentran por encima de 0, generando una interpretación de que los recuentos de plaquetas mediante el método “RDOP” son menores que del método “PLTO”, así mismo, para el caso del **gráfico 17**, las diferencias entre las mediciones (línea negra continua) se encuentran por debajo de 0, generando una interpretación de que los recuentos de plaquetas mediante el método “RILP” tienden a sobreestimar los recuentos. Por otro lado, el **gráfico 16** muestra que la diferencia tuvo un valor cercano a 0 y se encontró dentro de los límites de concordancia, demostrando que el método “RDMP” y el método “PLTO” produjeron resultados muy próximos.

Tabla 9. Test de Bland-Altman (análisis de diferencias individuales)

	“ORIGINAL”	“MODIFICADO”	“LÁMINA PERIFÉRICA”
Nº DE VALORES	108	108	108
BIAS	44666.7	27.8421	-71333.3
95% LC bajo	1211.36	-49739.6	-122066
95% LC alto	88122.0	49795.3	-20600.9

Nº: Número. LC: Límites de concordancia. “ORIGINAL”: recuento directo original de plaquetas “RDOP”. “MODIFICADO”: recuento directo modificado de plaquetas “RDMP”. “LÁMINA PERIFÉRICA”: recuento indirecto mediante lámina periférica “RILP”.

M. automatizado vs M. original

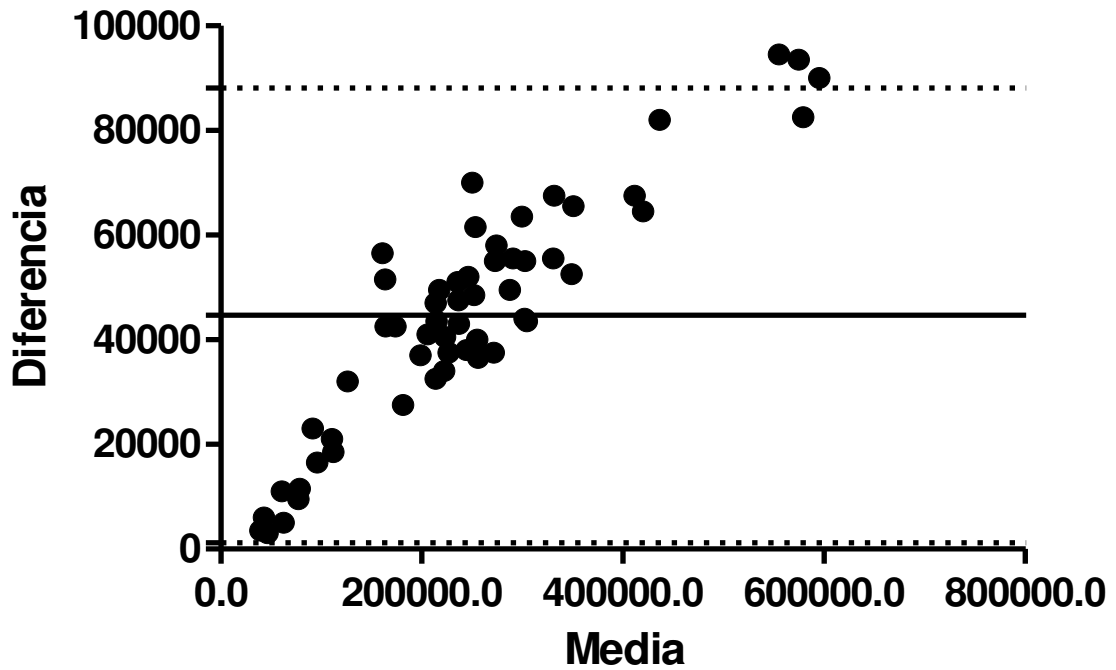


Gráfico 15. Test de Bland-Altman: “Difference plot” para las metodologías “PLTO” y “RDOP”

M. automatizado vs M. modificado

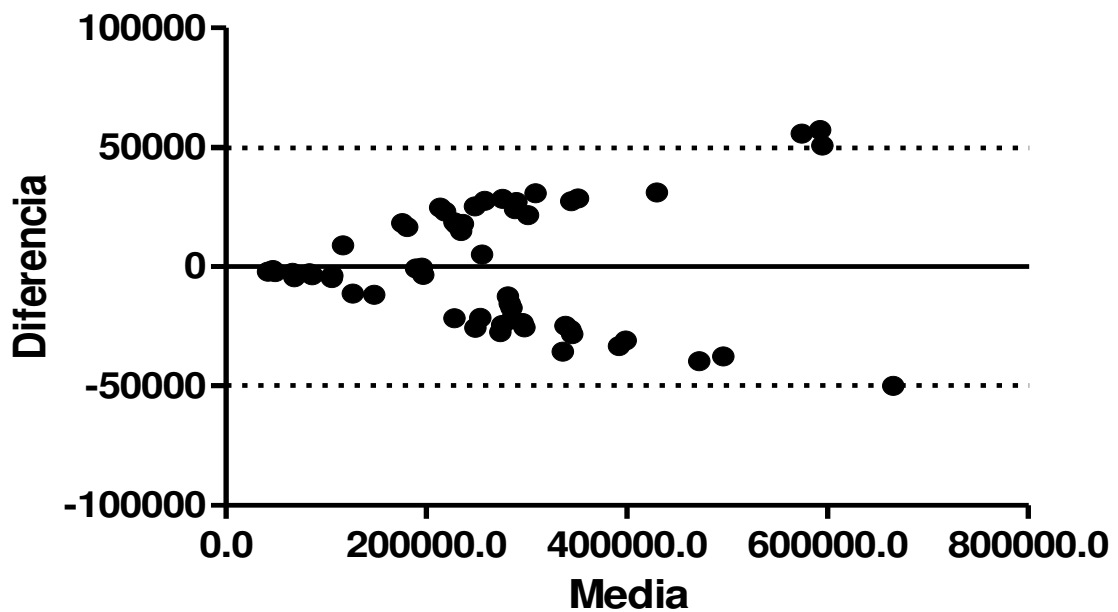


Gráfico 16. Test de Bland-Altman: “Difference plot” para las metodologías “PLTO” y “RDMP”

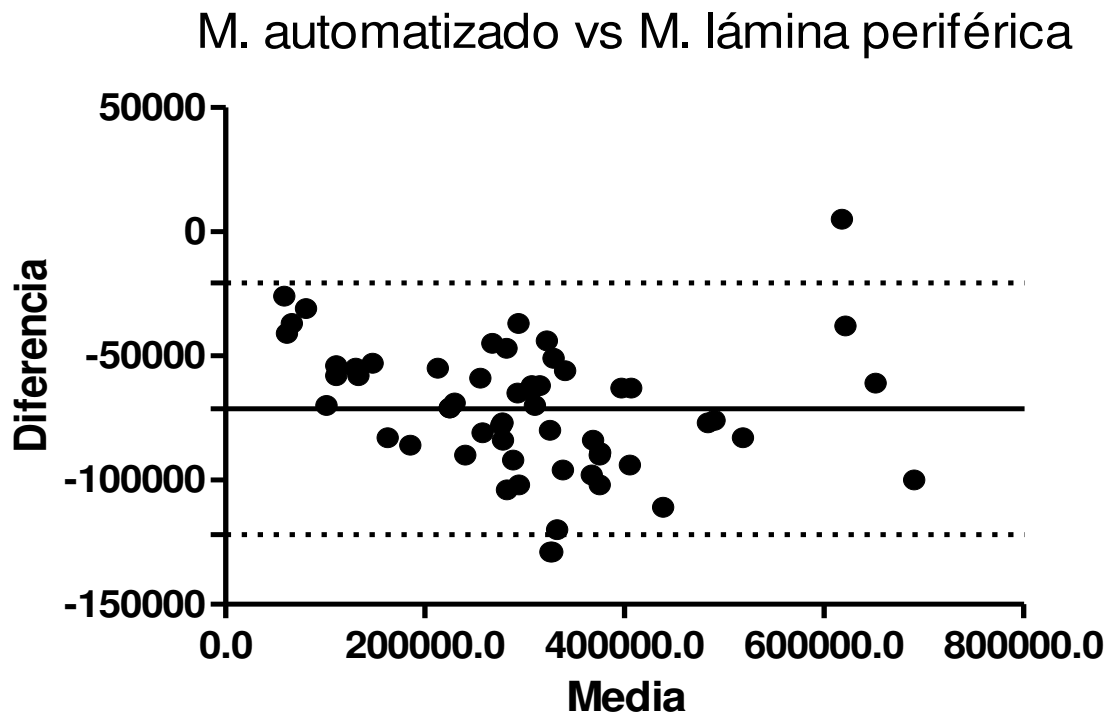


Gráfico 17. Test de Bland-Altman: “Difference plot” para las metodologías “PLTO” y “RILP”

4.9. Determinación del desempeño de calidad e indicadores de desempeño

A partir de los datos recolectados mediante las metodologías “RDOP”, “RDMP” y “RILP” en cada uno de los niveles 1, 2 y 3 (bajo, normal y alto, respectivamente) de los controles internos, se realizó el cálculo de la media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación (**Tablas 10, 11 y 12**); y se observó que el método “RILP” presentó los valores más altos. Luego, se compararon los resultados con información interlaboratorial del mismo lote (**Tabla 13**) brindada por el mismo proveedor y un requisito de la calidad para el recuento de plaquetas dado por CLIA. (**Tablas 14, 15 y 16**)

Junto con el hallazgo del desempeño de calidad, se realizó el cálculo de algunos indicadores de desempeño, como el índice de error total, el coeficiente de variación relativo y el sesgo relativo; las **tablas 14 y 16** mostraron que los

métodos “RDOP” y “RILP” presentaron desempeños deficientes, mientras que, inesperadamente, se observó que solo el método “RDMP” presentó un desempeño aceptable. (Tabla 15)

Tabla 10. Media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación del método “RDOP” a partir de los controles internos

CONTROLES INTERNOS			
	NIVEL 1	NIVEL 2	NIVEL 3
MEDIA	66	181	399
DS	10.4	12.0	23.0
CV	16%	7%	6%

Media: media aritmética. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación. NIVEL 1: bajo. NIVEL 2: normal. NIVEL 3: alto.

Tabla 11. Media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación del método “RDMP” a partir de los controles internos

CONTROLES INTERNOS			
	NIVEL 1	NIVEL 2	NIVEL 3
MEDIA	81	221	485
DS	8.5	13.6	41.6
CV	11%	6%	9%

Media: media aritmética. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación. NIVEL 1: bajo. NIVEL 2: normal. NIVEL 3: alto.

Tabla 12. Media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación del método “RILP” a partir de los controles internos

CONTROLES INTERNOS			
	NIVEL 1	NIVEL 2	NIVEL 3
MEDIA	139	338	603
DS	14.2	34.7	41.9
CV	10%	10%	7%

Media: media aritmética. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación. NIVEL 1: bajo. NIVEL 2: normal. NIVEL 3: alto.

Tabla 13. Media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación de la información interlaboratorial según los niveles establecidos. Información interlaboratorial del mismo lote de los controles internos, según la metodología de recuento de plaquetas “PLTO” que realiza el equipo automatizado hematológico Abbott CELL-DYN Ruby para los niveles 1, 2 y 3.

CONTROL INTERLABORATORIAL			
	NIVEL 1	NIVEL 2	NIVEL 3
MEDIA	82	217	485
DS	6	10.9	20.8
CV	7%	5%	4%

Media: media aritmética. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación. NIVEL 1: bajo. NIVEL 2: normal. NIVEL 3: alto.

Tabla 14. Determinación del desempeño de calidad e indicadores de desempeño para el método “RDOP” según los niveles establecidos. Los indicadores de rendimiento se consideran buenos cuando son <1, borderline cuando son <2 y deficientes cuando son >2. Para el caso del sesgo y ET se consideraron valores enteros.

	NIVEL 1	NIVEL 2	NIVEL 3
V.A. Sesgo	20%	17%	18%
ET	90%	76%	38%
RQ (CLIA)	25%	25%	25%
Desempeño	DEFICIENTE	DEFICIENTE	DEFICIENTE
IET	3.6	3.1	1.5
CVR	1.2	1.2	0.8
SR	11.1	8.9	3.9

V.A. Sesgo: Valor absoluto del sesgo. ET: error total, RQ: requisito de la calidad, IET: índice de error total, CVR: coeficiente de variación relativo, SR: sesgo relativo. NIVEL 1: bajo. NIVEL 2: normal. NIVEL 3: alto.

Tabla 15. Determinación del desempeño de calidad e indicadores de desempeño para el método “RDMP” según los niveles establecidos. Los indicadores de rendimiento se consideran buenos cuando son <1, borderline cuando son <2 y deficientes cuando son >2. Para el caso del sesgo y ET se consideraron valores enteros.

	NIVEL 1	NIVEL 2	NIVEL 3
V.A. Sesgo	2%	2%	0%
ET	18%	9%	4%
RQ (CLIA)	25%	25%	25%
Desempeño	ACEPTABLE	ACEPTABLE	ACEPTABLE
IET	0.7	0.4	0.2
CVR	1.0	0.4	0.2
SR	0.2	0.3	0.0

V.A. Sesgo: Valor absoluto del sesgo. ET: error total, RQ: requisito de la calidad, IET: índice de error total, CVR: coeficiente de variación relativo, SR: sesgo relativo. NIVEL 1: bajo. NIVEL 2: normal. NIVEL 3: alto.

Tabla 16. Determinación del desempeño de calidad e indicadores de desempeño para el método “RILP” según los niveles establecidos. Los indicadores de rendimiento se consideran buenos cuando son <1, borderline cuando son <2 y deficientes cuando son >2. Para el caso del sesgo y ET se consideraron valores enteros.

	NIVEL 1	NIVEL 2	NIVEL 3
V.A. Sesgo	70%	56%	24%
ET	90%	76%	38%
RQ (CLIA)	25%	25%	25%
Desempeño	DEFICIENTE	DEFICIENTE	DEFICIENTE
IET	3.6	3.1	1.5
CVR	1.2	1.2	0.8
SR	11.1	8.9	3.9

V.A. Sesgo: Valor absoluto del sesgo. ET: error total, RQ: requisito de la calidad, IET: índice de error total, CVR: coeficiente de variación relativo, SR: sesgo relativo. NIVEL 1: bajo. NIVEL 2: normal. NIVEL 3: alto.

V. DISCUSIÓN

El método automatizado por recuento óptico de plaquetas fue tomado como referencia en este estudio debido a la confiabilidad que genera esta metodología y que ha sido también tomado como referencia por otros estudios.²³⁻²⁴ No obstante, estos principios tienen limitaciones, la correlación disminuye en presencia de interferentes, como por ejemplo, fragmentación de eritrocitos o leucocitos, lípidos, crioaglutininas, entre otros; así lo demostró Congona R.¹³ Por lo tanto, el laboratorio clínico siempre está requiriendo otras metodologías para confirmar estos recuentos.

El método que mostró una mayor dispersión de datos con respecto a su media, fue el "RILP", siendo por lo tanto, el que menor precisión tuvo con respecto a los demás métodos. Se observó una disminución del coeficiente de variación interobservador con respecto al reportado en otros estudios,^{13,25} en el cual, el uso de 20 muestras para el cálculo también ha sido usado en otros trabajos de investigación.²⁶⁻²⁷ Esto demostró que el método "RDMP", mejora el reconocimiento de las plaquetas por los observadores, debido a que ahora también se puede tomar en cuenta el color.

Para el caso de la regresión lineal, las pendientes en todos los casos evaluados tienen signo positivo por lo que la relación que existe es proporcional. El método "RDMP", obtuvo el menor coeficiente de determinación (R^2), que fue de 0.9680, esto significa que puede predecir y replicar mejor futuros resultados. Además los residuos generados también por este método presentaron menor alejamiento de la media (0), esto significa que son lo que tienen mayor grado de exactitud. El hecho de que el método "RDMP" tuvo el menor BIAS o también llamado Sesgo (Test de Bland - Altman), no generó admiración, debido a la facilidad de reconocimiento de las plaquetas (CV interobservador también disminuido) y que se consideró adecuada la población debido a que tamaños similares ya han sido considerados en otros estudios;²³⁻²⁴ y que el tipo de muestreo que se utilizó

(probabilístico de tipo aleatorio simple), genera que se puede medir el tamaño del error en las predicciones y reducir al mínimo el error.²⁸

Esta sobreestimación con respecto al automatizado por parte de la gran mayoría de métodos en lámina periférica, genera que no se recomiende para contar plaquetas de manera general (valores normales, altos o bajos) y por ende, el valor que aporta para poder confirmar recuentos del equipo automatizado, es deficiente; esto también ya ha sido reportado en otros estudios.²⁹⁻³⁰

Por ese motivo, guías como la del Instituto de Salud Pública de Chile: “Recomendaciones para la interpretación del hemograma: Serie roja, blanca y plaquetaria” sólo sugieren el reporte de resultado mediante cruces o un rango promedio de plaquetas por campo.³¹

Una limitación es el tiempo que necesita el método G&S para poder generar resultados confiables (17 minutos), sin embargo, como sólo utiliza un lado de la cámara de Neubauer, se pueden obtener 2 resultados (2 pacientes) en ese tiempo aproximadamente. Además, el tiempo de preparación del colorante (20 minutos) se considera despreciable para tomar en cuenta en la realización de la prueba, ya que si preparamos sólo 100 mL, se podrá realizar más de 3300 ensayos (30 uL por prueba); el costo de los reactivos también resultó muy económico ya que se recibió un presupuesto proveniente de una empresa vendedora de reactivos y colorantes (**Anexo 12**), generando un costo promedio por prueba de 0.5 dólares para el laboratorio.

Por esa razón, existen trabajos de investigación que destacan el valor de un recuento directo (cámara de Neubauer) de plaquetas de manera general (valores normales, altos o bajos) para laboratorios de hematología, como los que realizaron Anilema M.³² y Zabala N.³³; e inclusive en procedimientos para laboratorios de banco de sangre (plasma pobre en plaquetas), así lo demostró

Leena J.²³ Igualmente, existen guías y manuales que recomiendan también métodos de recuento directo como la que realizaron Kitchen S et al.³⁴ (2010) cuyo título fue “Diagnóstico de Hemofilia y otros trastornos de la coagulación” y que el vigente manual de procedimientos de laboratorio en técnicas básicas de hematología del Instituto Nacional de Salud del Perú (2005) también lo sugiere.³⁵

VI. CONCLUSIONES

El método “RDMP” es comparable con la metodología automatizada para el recuento de plaquetas.

El método “RDMP” presenta mayor fiabilidad estadística, es práctico y económico, confirmando entonces, la utilidad del azul de metileno bajo las condiciones de muestreo y tipo de muestras evaluadas en este estudio.

El método “RDMP” no sólo es estadísticamente aceptable, sino también presenta un desempeño de calidad aceptable, siendo confiable en la toma de decisiones médicas.

VII. RECOMENDACIONES

Por todo lo anteriormente expuesto, se sugiere que se sigan las siguientes recomendaciones:

1. Al no existir trabajos de investigación que empleen el uso de colorantes para un recuento directo, este estudio pretende ser base para poder orientar posteriores publicaciones donde se trabaje con muestras solamente patológicas, se analice por separado cada interferente que puede influir en los recuentos plaquetarios o en casos de trombocitopenias severas, por consecuencia, se requiera comparar metodologías automatizadas y otras formas de recuento que verdaderamente puedan cuantificar plaquetas.
2. No se deben utilizar otros tipos de azul de metileno, ya que el autor de este estudio utilizó los más frecuentemente usados (acuosos, alcohólicos, de loeffler, entre otros); sin poder encontrar resultados similares al uso del azul de metileno de "HAMA"; ya que con los otros tipos de azul de metileno se necesitó de una gran cantidad de volumen para poder colorear a las plaquetas en la cámara, alterando la dilución y por consecuencia, el reporte de resultados.
3. Si ya se cuenta con azul de metileno al 1%, sí es posible solo poder añadir bicarbonato de sodio y calentar la solución, en la cantidad y tiempo necesario para su uso, según lo especificado.
4. La marca comercial de la cámara de neubauer que se usó fue *Marienfeld*, sin embargo, sí es posible utilizar otras marcas comerciales; solamente deben cumplir con los estándares de calidad para su elaboración y se sugiere que sean cámaras de neubauer mejoradas (o también denominadas *improved*), es decir que contengan una triple de línea en el retículo para la realización del recuento.

5. Si la aplicación del recuento directo se realizará diariamente, se recomienda separar una pequeña cantidad de oxalato de amonio al 1% y guardarlo en un lugar con ventilación constante y sin exponerlo a la luz. Si la frecuencia de uso no es así, se recomienda almacenarlo en refrigeración y la solución puede ser usada mientras se mantenga transparente.
6. Oficialmente, se utilizaron tubos de 12x75 mm para este estudio, sin embargo, el autor también manifiesta que se pueden usar otros tamaños de tubo de manera alternativa, pero con la misma condición, es decir que sean de plástico.
7. El autor de este estudio también recomienda el uso de una cámara de celular (mínimo 12 megapíxeles), como alternativa para poder realizar los recuentos en la cámara de Neubauer mediante el método "RDMP", es decir, se toman imágenes de los 4 lados especificados y se procede a su agrandamiento, ya que fue una opción muy preferida por los tecnólogos médicos participantes que realizaron los recuentos plaquetarios mediante éste método.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fink N. Automatización en hematología. Hematología. En.-Abr. 2005;9(1):2-11.
2. Campuzano G. Del hemograma manual al hemograma de cuarta generación. Medicina & Laboratorio 2007;13:11-12.
3. Maluendo F. Blogspot: Laboratorio de Hematología [Internet]. Perú. 2015 [Consulta 10 octubre 2016]. Disponible en: <http://laboratoriohematologiadefelipe.blogspot.pe/2015/08/recuento-de-plaquetas.html>.
4. Guerci A. Examen físico de la sangre. En: Bergel M, editor. Laboratorio. Argentina: El Ateneo; 1979. p. 138-139.
5. Lynch M, Raphael S, Mellor L, Spare P, Inwood M. Obtención de muestras de sangre y citometría hemática. En: Folch R, editor. Métodos de Laboratorio. México: Nueva Editorial Interamericana; 1972. p. 713.
6. Lewis S, Bain B, Bates I. Hematología en laboratorios de recursos escasos. En: Elsevier España, editor. Dacie y Lewis Hematología práctica. España: Elsevier; 2008. p. 580-581.
7. Rodak B. Pruebas de rutina en hematología. En: Giovaniello O, Oxemberg J, Rondinone S, Taveira J, editores. Hematología fundamentos y aplicaciones clínicas. Argentina: Médica Panamericana; 2004. p. 159-160.
8. Montengua L, Esteban F, Calvo A. Procesamiento de muestras para microscopía óptica y tinciones. En: Elsevier España, editor. Técnicas en histología y biología celular. España: GEA consultoría; 2009. p. 72-73.

9. Crocker J, Burnett D. Análisis de plaquetas. En: Tovar M, editor. La ciencia del diagnóstico de laboratorio. México: McGraw-Hill-Interamericana; 2007. p. 290.
10. Sans-Sabrafen J. Fisiología y exploración de la hemostasia. En: Besses C. Editor. Hematología Clínica. España: Mosby/Doyma libros; 1994. p. 491.
11. Lynch M, Raphael S, Mellor L, Spare P, Inwood M. Obtención de muestras de sangre y citometría hemática. En: Folch R, editor. Métodos de laboratorio. México: Nueva Editorial Interamericana; 1980. p. 706-707.
12. Hernández L. Avances y aplicación clínica de la citometría hemática automatizada. Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia. 2013;29(1):24-39.
13. Congona R. Influencia de interferentes en el recuento plaquetario en pacientes hemato-oncológicos mediante el principio de impedancia y recuento óptico/fluorescente en el analizador SYSMEX XE-2100 FULL. [tesis]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina; 2011.
14. Lillie R. Quinone-Iminedyes. In: Lillie R, Stotz E, Emmel V, Darrow M, editors. H.J.Conn's Biological Stains. United States: The Williams & Wilkins Company; 1969. p. 299-302.
15. García del Moral R. Fundamentos generales de coloración. En: Raimundo García de Moral Garrido, editor. Laboratorio de Anatomía Patológica. España: McGraw-Hill-Interamericana de España; 1993. p. 124-126.

16. Lillie R. Quinone-Iminedyes. In: Lillie R, Stotz E, Emmel V, Darrow M, editors. H.J.Conn's Biological Stains. United States: The Williams & Wilkins Company; 1969. p. 430.
17. Balsam F. Estimation of Platelet Count on the basis of Red Cell: Platelet Ratio. Iraqi Journal of medical sciences. 2009;7(3):40-45.
18. Conde S, Rodríguez R. Concordancia en el recuento e identificación morfológica de plaquetas en frotís sanguíneo entre tecnólogos médicos de hospitales e institutos especializados de Lima metropolitana y Callao, Octubre 2017 - Marzo 2018. [tesis]. Perú: Universidad Norbert Wiener. Facultad de ciencias de la salud; 2018.
19. Harrison P, Kenneth A, Chapman S, Charie L, Davis B, Fujimoto K, et al. An interlaboratory study of a candidate reference method for platelet counting. Coagulation and Transfusion Medicine.2001;115:448-459.
20. Superintendencia Nacional de Salud. Intendencia de Investigación y Desarrollo. Infraestructura del sector salud por tipo de establecimiento, según departamento, 2016 (número de establecimientos). Lima: Superintendencia Nacional de Salud. 2016.
21. Brecher G, Cronkite E. Morphology and enumeration of human blood platelets. Journal of Applied Physiology. 1950;3:365-377.
22. Brecher G, Cronkite E, Schneiderman M. The reproducibility and constancy of the platelet count. American Journal of Clinical Pathology. 1953;23:15-26.

23. Leena J, Devaraju S, Saldhana C. A comparative study of Platelet counts by manual and automathed methods in platelet poor plasma”. International Journal of Recent of Recent Trends in Science and Technology. Sept. 2014;12(2): 262-265.
24. Pan L, Chen Ch, Huang W, Sun Ch. Enhanced Accuracy of Optical Platelet Counts in Microcytic Anemia. Lab Medicine. 2014;45(1):32-36.
25. Banfi G, Salvagno GL, Lippi G. The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2007;45(5):565-576.
26. Brambila E, Castillo R, Lozano P. Comparación entre tres métodos manuales empleados en la cuenta diferencial de leucocitos respecto a un equipo automatizado. Bioquímica. 2003;28(3):4-12.
27. García F. Evaluación de la calidad de vida y remodelado cardíaco en pacientes sometidos a ablación de flúter auricular dependiente del istmo cavo-tricuspídeo [tesis doctoral]. España: Universidad de Santiago de Compostela Facultad de Medicina; 2009.
28. Hernández S, Fernández C, Baptista L. Selección de muestra. En: Rocha M, editor. Metodología de la Investigación. México: McGRAW-HILL/INTERAMERICANA; 2014. p. 177.
29. Gómez S. Comparación del método de fluorescencia, impedancia y microscopía óptica en el recuento de plaquetas en distintos grupos de pacientes. Conferencia Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia. En: Sesión laboratorio básico y automatización en hematología. España; 2017.

30. Rachid M, Al-Farsi R, Al-Hashmi S, Al-Riyami H, Khan H, Al-kindí S. Comparative analysis of four methods for enumeration of platelet counts in thrombocytopenic patients. *Journal of Applied Hematology*. 2015;6(3):119-124.
31. Retamales E. Recomendaciones del informe del frotis sanguíneo serie plaquetaria. En: Moscoso H, Ramírez V, editores. Recomendaciones para la interpretación del hemograma: Serie roja, blanca y plaquetaria. Chile: Comité editor Instituto de Salud Pública; 2015. p. 20-22.
32. Anilema M, Baños G. Importancia de las determinaciones de proteinuria de 24 horas y conteo de plaquetas como ayuda diagnóstica de preeclampsia en mujeres embarazadas que acuden al hospital Gineco Obstétrico Isidro Ayora en la ciudad de Quito durante el período octubre 2015- marzo 2016 [tesis]. Quito: Universidad Nacional de Chimborazo. Facultad de Ciencias de la Salud; 2016.
33. Zabala N, Hannaqui E. Comparación del conteo plaquetario empleando diferentes metodologías, en pacientes con purpura trombocitopénica y síndromes mielodisplásicos. *Saber*. 2013;25(3):259-264.
34. Kitchen S, McCraw A, Echenagucia M. Platelet Count. In: Ahmed M, Lam C, de Bosch N, Nair S, Chuansumrit A, Street A, Echenagucia M, Srivastava A, Hillarp A, editors. *Diagnosis of Hemophilia and Other Bleeding Disorders*. Canada: World Federation of Hemophilia; 2010. p. 30-34.
35. Muñoz M, Morón C. Recuento de reticulocitos y plaquetas. En: Cabezas C, Cabrera R, editores. *Manual de procedimientos de laboratorio en técnicas básicas de hematología*. Perú: Comité Editor Instituto Nacional de Salud; 2005. p. 60-62.

IX. ANEXOS

ANEXO 1

TÍTULO: Utilidad del azul de metileno para el recuento de plaquetas en la cámara de Neubauer

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN	CATEGORÍA O UNIDAD
Utilidad del azul de metileno	Capacidad del azul de metileno para mejorar la visualización plaquetaria	Plaquetas visualizadas de azul en la cámara de Neubauer	Dependiente Cualitativa	Ordinal Dicotómica	0 = No 1 = Sí
Recuento de plaquetas en la cámara de Neubauer	Número de plaquetas por microlitro calculado en la cámara de Neubauer	Total de plaquetas contadas en cuatro cuadrantes terciarios del cuadrante secundario central en la cámara de Neubauer y multiplicado por un factor	Independiente Cuantitativa	Razón Discreta	N# de plaquetas

ANEXO 2

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Nombre del Tecnólogo Médico participante: *Marimón Pacheco Augusto Adán*

Marque con una (X) en relación a las características observadas durante el recuento plaquetario directo propuesto:

1) COLORACIÓN AZUL: Sí (X) No ()

2) REFRINGENCIA: Sí (X) No ()

3) CANTIDAD*: Baja $\leq 150\ 000/\mu\text{L}$ (X) $150\ 000 \leq$ Normal $\leq 450\ 000/\mu\text{L}$ ()
Alta $\geq 450\ 000/\mu\text{L}$ ()

*Especifique: *107 775 plaquetas/ μL*

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Nombre del Tecnólogo Médico participante: *Barboza León Fridy Max*

Marque con una (X) en relación a las características observadas durante el recuento plaquetario directo propuesto:

1) COLORACIÓN AZUL: Sí (X) No ()

2) REFRINGENCIA: Sí (X) No ()

3) CANTIDAD*: Baja $\leq 150\ 000/uL$ () $150\ 000 \leq$ Normal $\leq 450\ 000/uL$ (X)

Alta $\geq 450\ 000/uL$ ()

*Especifique: *235 750 plaquetas/uL*

ANEXO 3

OPINION DEL JUEZ EXPERTO SOBRE EL INSTRUMENTO DE INVESTIGACIÓN

TITULO DEL PROYECTO: "Utilidad del azul de metileno para el recuento de plaquetas en la cámara de Neubauer"

NOMBRE DEL EGRESADO: Gian Carlos Ramirez Ubillus

DATOS DEL JUEZ EXPERTO

NOMBRE Y APELLIDOS: *María del Carmen Donayre Azán*

CARGO ACTUAL: *Especialista en Histotecnología, Maestría en administración de servicios de salud
Tecnólogo médico del Hospital Guillermo Almenara Irigoyen - Área de Histotecnología*

INSTRUCCIONES

A continuación se presenta 7 criterios, los cuales permitirán obtener su apreciación del instrumento del proyecto de investigación, siendo esto de gran importancia ya que nos permitirá realizar los ajustes correspondientes y obtener un instrumento más confiable.

Nº	CRITERIOS	SI	NO	Señale la pregunta o el ítem que debe modificarse
1	El instrumento propuesto responde al problema de investigación.	X		
2	Las instrucciones son claras y orientan al desarrollo del instrumento.	X		
3	Las preguntas o ítems permitirán lograr los objetivos del estudio.	X		
4	Las preguntas o ítems responden a la operacionalización de las variables.	X		
5	El número de preguntas o ítems es adecuado.	X		
6	Las preguntas o ítems están redactados en forma clara y entendible para la población en estudio.	X		
7	Eliminaría alguna pregunta o ítem.		X	

SUGERENCIAS:


Lic. María Del Carmen Donayre Azán
Sello y Firmado por el Juez Experto
C.T.M.P. 5718

OPINION DEL JUEZ EXPERTO SOBRE EL INSTRUMENTO DE INVESTIGACIÓN

TITULO DEL PROYECTO: "Utilidad del azul de metileno para el recuento de plaquetas en la cámara de Neubauer"

NOMBRE DEL EGRESADO: Gian Carlos Ramirez Ubillus

DATOS DEL JUEZ EXPERTO


NOMBRE Y APELLIDOS: **Willy CERON TELLO**
MAESTRIA EN INMUNOLOGIA - ESPECIALISTA EN INMUNOHEM. Y BANCO DE SANGRE
CARGO ACTUAL: **TECNOLOGO MEDICO DEL SERU. MEDICINA TRANSFUSIONAL
HOSPITAL EDUARDO REBAGLIATI.
DOCENTE UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA**

INSTRUCCIONES

A continuación se presenta 7 criterios, los cuales permitirán obtener su apreciación del instrumento del proyecto de investigación, siendo esto de gran importancia ya que nos permitirá realizar los ajustes correspondientes y obtener un instrumento más confiable.

Nº	CRITERIOS	SI	NO	Señale la pregunta o el ítem que debe modificarse
1	El instrumento propuesto responde al problema de investigación.	X		
2	Las instrucciones son claras y orientan al desarrollo del instrumento.	X		
3	Las preguntas o ítems permitirán lograr los objetivos del estudio.	X		
4	Las preguntas o ítems responden a la operacionalización de las variables.	X		
5	El número de preguntas o ítems es adecuado.	X		
6	Las preguntas o ítems están redactados en forma clara y entendible para la población en estudio.	X		
7	Eliminaría alguna pregunta o ítem.		X	

SUGERENCIAS:


Willy Cerón Tello
Tecnólogo Médico
2022

Sello y firma del juez experto

OPINION DEL JUEZ EXPERTO SOBRE EL INSTRUMENTO DE INVESTIGACIÓN

TITULO DEL PROYECTO: "Utilidad del azul de metileno para el recuento de plaquetas en la cámara de Neubauer"

NOMBRE DEL EGRESADO: Gian Carlos Ramirez Ubillus

DATOS DEL JUEZ EXPERTO JOSE MANUEL CONDOR CAPCHA
DOCTORADO Y MAESTRIA EN CIENCIAS
NOMBRE Y APELLIDOS: JEFE DE LABORATORIO
CARGO ACTUAL: CENTRO DE MEDICINA REGENERATIVA Y TERAPIAS CELULARES
* DOCENTE DE BANCO DE SANGRE
UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

INSTRUCCIONES

A continuación se presenta 7 criterios, los cuales permitirán obtener su apreciación del instrumento del proyecto de investigación, siendo esto de gran importancia ya que nos permitirá realizar los ajustes correspondientes y obtener un instrumento más confiable.

Nº	CRITERIOS	SI	NO	Señale la pregunta o el ítem que debe modificarse
1	El instrumento propuesto responde al problema de investigación.	X		
2	Las instrucciones son claras y orientan al desarrollo del instrumento.	X		
3	Las preguntas o ítems permitirán lograr los objetivos del estudio.	X		
4	Las preguntas o ítems responden a la operacionalización de las variables.	X		
5	El número de preguntas o ítems es adecuado.	X		
6	Las preguntas o ítems están redactados en forma clara y entendible para la población en estudio.	X		
7	Eliminaría alguna pregunta o ítem.		X	

SUGERENCIAS:


Sello y firma del juez experto

Centro Medicina Regenerativa
y Terapias Celulares SAC - REGENCEL
RECEPCION
FIRMA

ANEXO 4

SOLICITUD DE PARTICIPACIÓN EN EL PROYECTO

Estimados miembros del laboratorio de hematología y del laboratorio de emergencia del Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé, el autor de este trabajo de investigación denominado "Utilidad del azul de metileno para el recuento de plaquetas en la cámara de Neubauer" solicita su participación como evaluador de los recuentos de plaquetas durante el mes de julio. Su participación en el estudio es totalmente voluntaria, el mismo no implica riesgo para usted y tiene derecho a retirarse cuando así lo deseara sin ninguna toma de alguna acción punitiva por su decisión. En caso de aceptar su participación en el estudio, complete los siguientes datos:

Yo Barboza León Frady Max, Tecnólogo Médico del Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé con número de DNI 09864633 acepto mi participación en el presente trabajo de investigación.



Firma del participante

SOLICITUD DE PARTICIPACIÓN EN EL PROYECTO

Estimados miembros del laboratorio de hematología y del laboratorio de emergencia del Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé, el autor de este trabajo de investigación denominado "Utilidad del azul de metileno para el recuento de plaquetas en la cámara de Neubauer" solicita su participación como evaluador de los recuentos de plaquetas durante el mes de julio. Su participación en el estudio es totalmente voluntaria, el mismo no implica riesgo para usted y tiene derecho a retirarse cuando así lo deseara sin ninguna toma de alguna acción punitiva por su decisión. En caso de aceptar su participación en el estudio, complete los siguientes datos:

Yo Marimón Pacheco Augusto Adán, Tecnólogo Médico del Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé con número de DNI 08312113 acepto mi participación en el presente trabajo de investigación.



Firma del participante

ANEXO 5

El recuento de plaquetas mediante la metodología realizada por el equipo hematológico automatizado Abbott CELL-DYN Ruby se encuentra descrito en el "Manual de Operaciones del Sistema", capítulo 3: "Principios del funcionamiento", sección: "Análisis de los eritrocitos y plaquetas (RBC/PLT)".

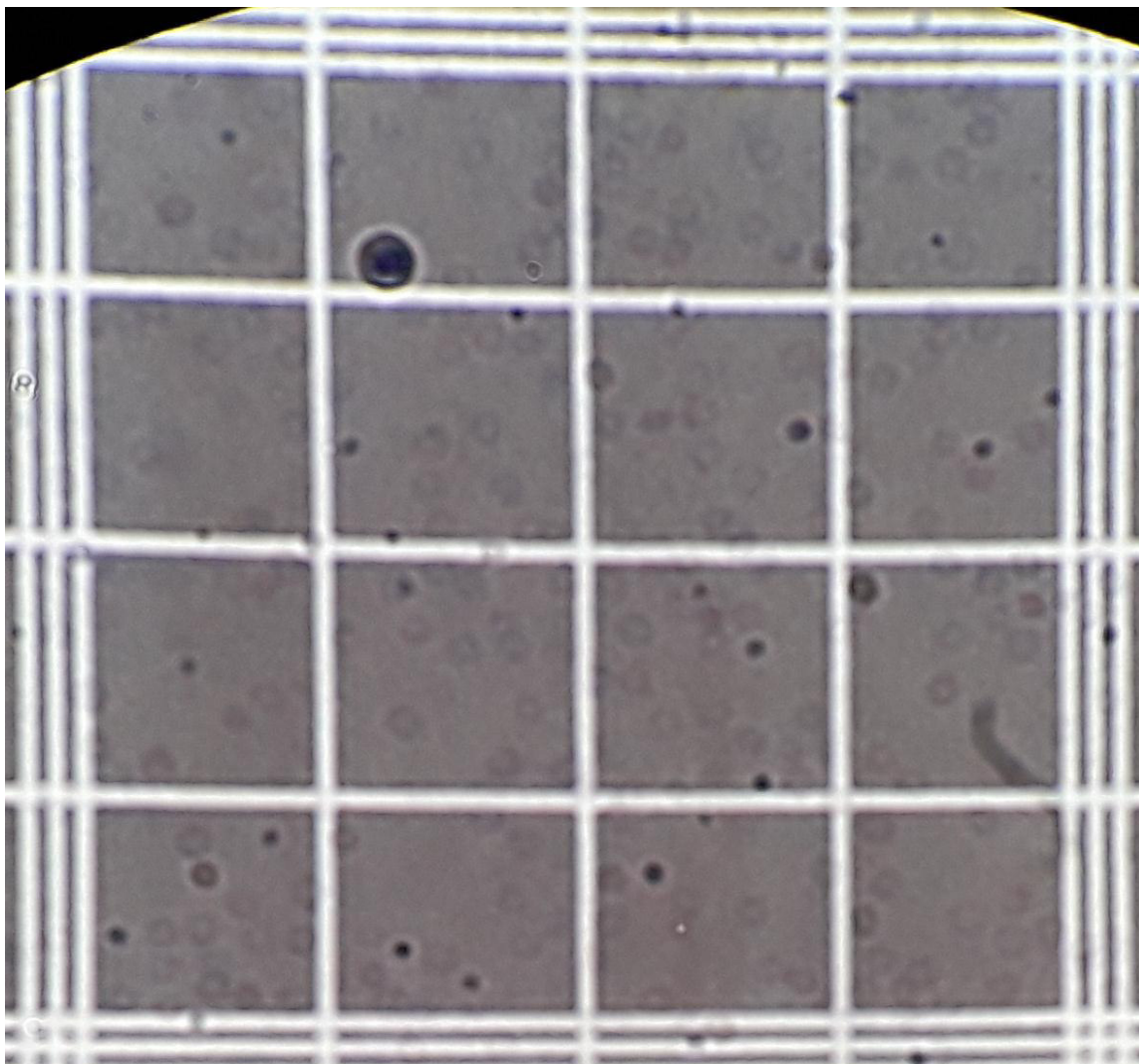
1. La jeringa del diluyente/reactivo envolvente dispensa 2,79 ml de diluyente a través de la válvula de segmentación, de los cuales 1,67 μ l se transfieren a la cámara de mezcla para el análisis de los eritrocitos.
2. Esta alícuota y el diluyente son dirigidos hacia la cámara de mezcla RBC/PLT, donde se mezcla la dilución. Finalmente, se obtiene una dilución 1:1675.
3. La bomba de transferencia conduce la dilución RBC/PLT de la cámara de mezcla a la tobera de inyección de muestra de la celda de flujo óptica.
4. El diluyente/reactivo envolvente, sometido a una presión constante en el depósito, se transfiere a la celda de flujo óptica.
5. La jeringa volumétrica dispensa secuencialmente 24 μ l de la dilución RBC/PLT en la celda de flujo con una presión (y velocidad) inferior a la del diluyente/reactivo envolvente.
6. Debido a que el reactivo envolvente, que rodea la dilución RBC/PLT, fluye a mayor velocidad y a la geometría especial de la celda de flujo, las células son enfocadas individualmente en el flujo de la dilución RBC/PLT para permitir su recuento.
7. Se enfoca un rayo láser hacia la celda de flujo. A medida que el flujo de muestra interacciona con el rayo láser, el esparcimiento lumínico se mide a 0°, 10° y 90° para los eritrocitos, y a 0° y 10° para las plaquetas.

ANEXO 6

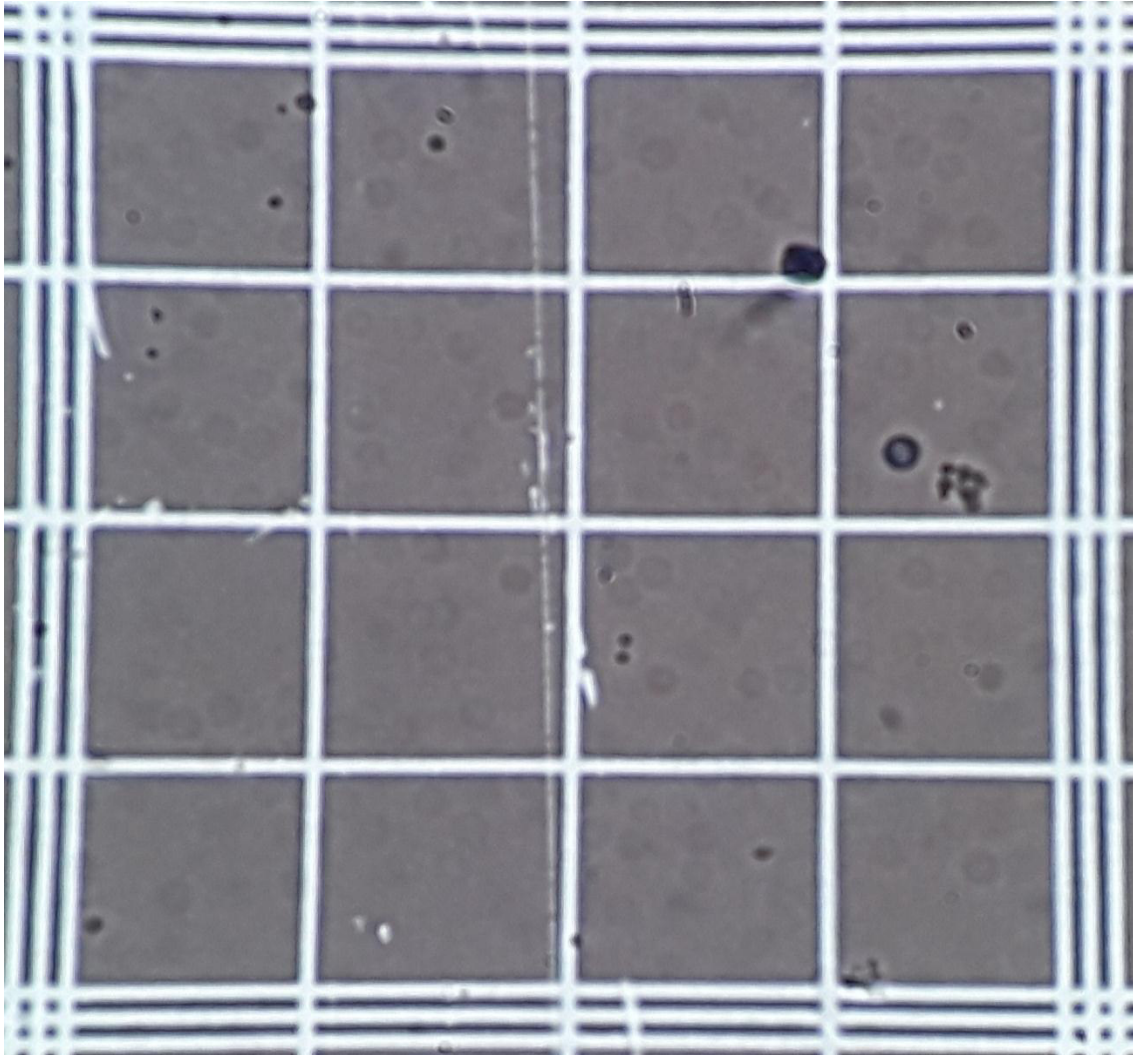
El recuento directo original de plaquetas siguió el siguiente protocolo:

1. A partir de una muestra sanguínea recolectada con EDTA dipotásico o tripotásico y que cumplió con los demás criterios de inclusión, se procedió a realizar una dilución 1/100 con oxalato de amonio al 1% en tubos de plástico de 12x75 mm (no se debe usar vidrio debido a que las plaquetas pueden adherirse a las paredes del tubo).
2. Luego, se homogenizó la mezcla brevemente y se cargó en ambos lados de la cámara de Neubauer. Se dejó reposar durante 15 minutos en una placa Petri que contuvo un pequeño trozo de algodón húmedo o un pedazo de papel filtro húmedo.
3. Finalmente, el conteo fue hecho mediante un microscopio de contraste de fases, tanto en el lado superior como inferior de la cámara, en la misma zona de recuento de hematíes (10 cuadrantes en total). Estas se pueden diferenciar de otros elementos debido a su color rosado o púrpura y refringencia. El número de plaquetas total contadas se multiplicó por 2500 dando como resultado el número de plaquetas/uL de sangre.

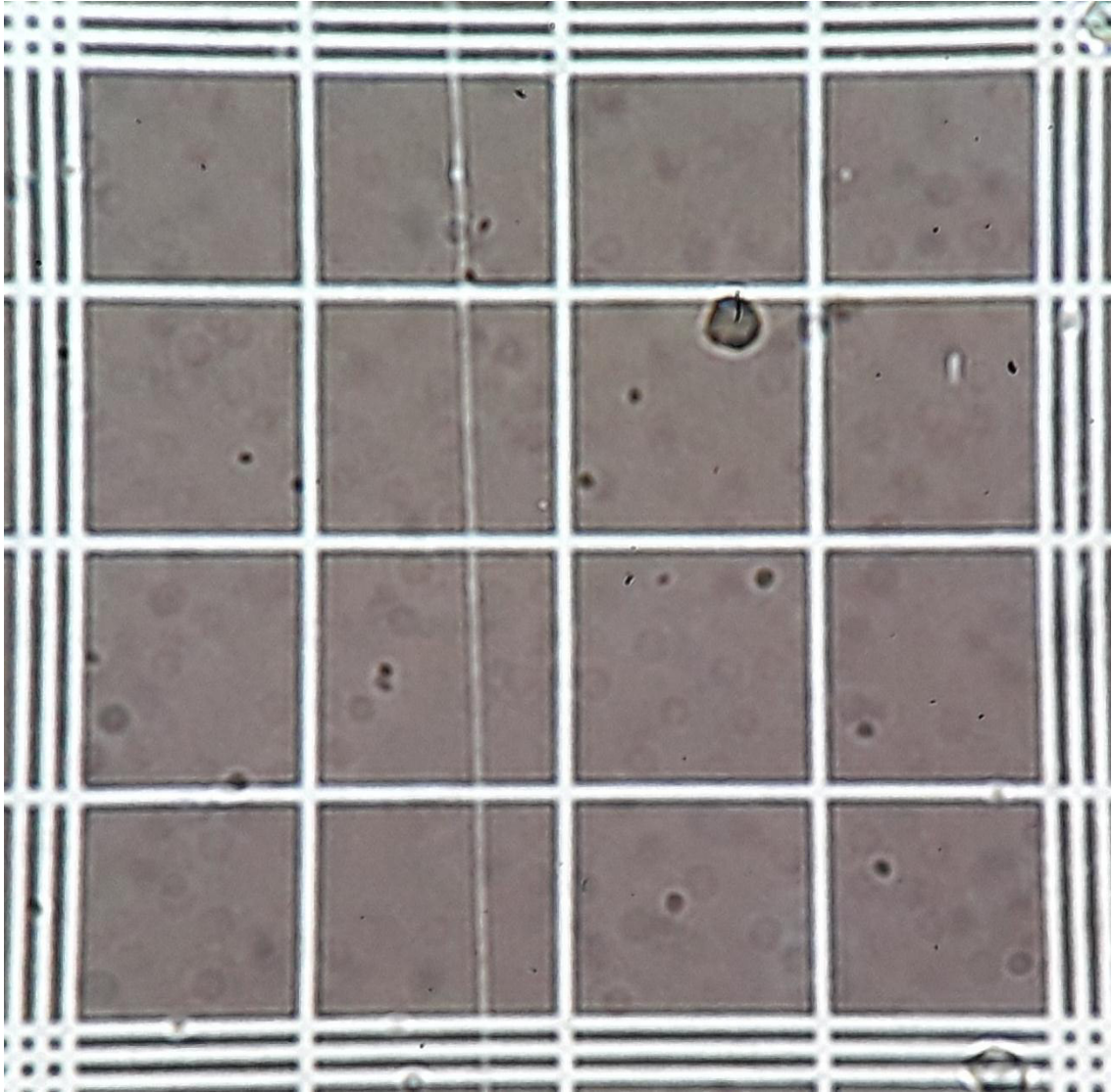
ANEXO 7: IMÁGENES ADICIONALES



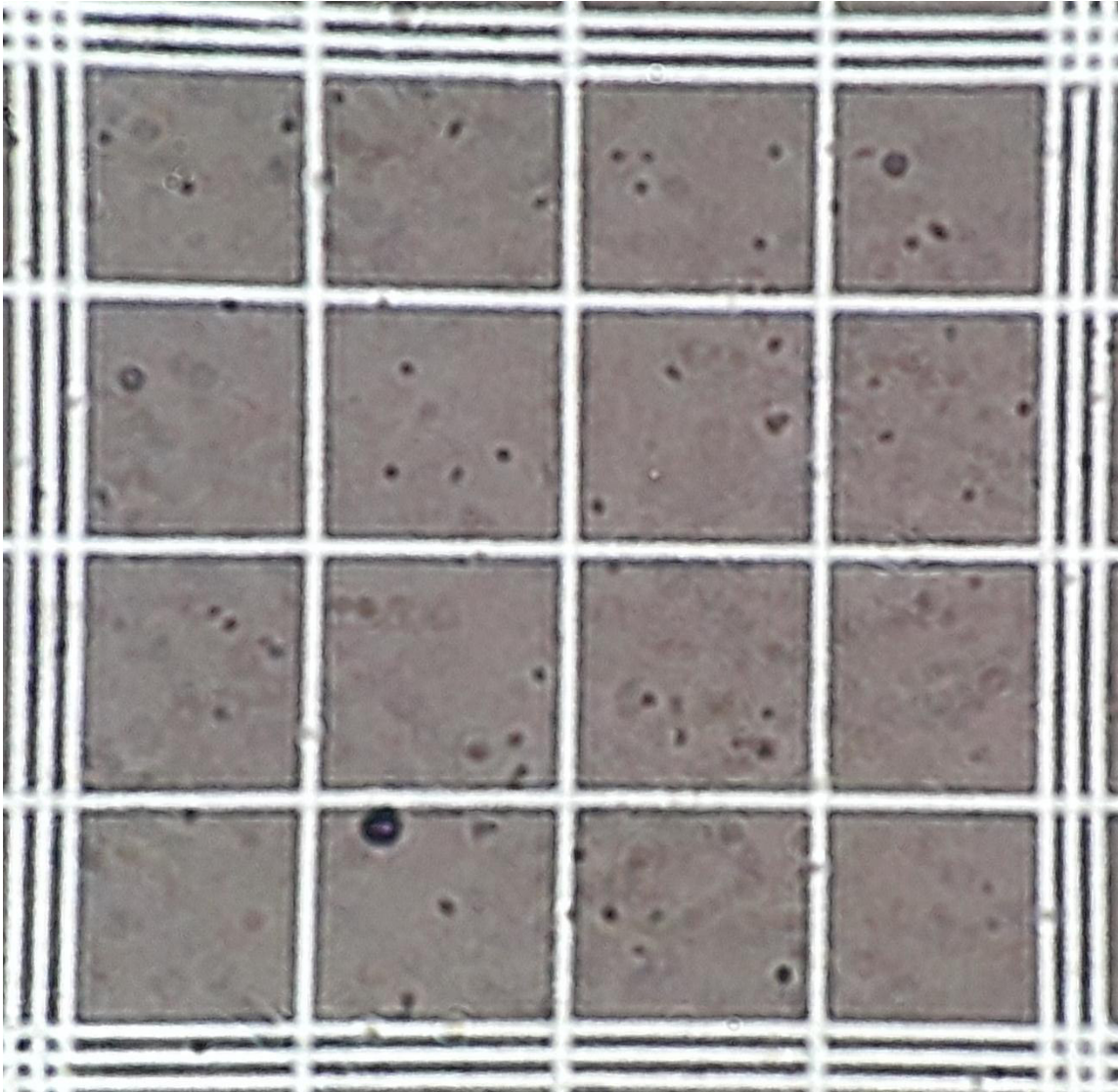
Plaquetas azules a 40x según el método "RDMP"



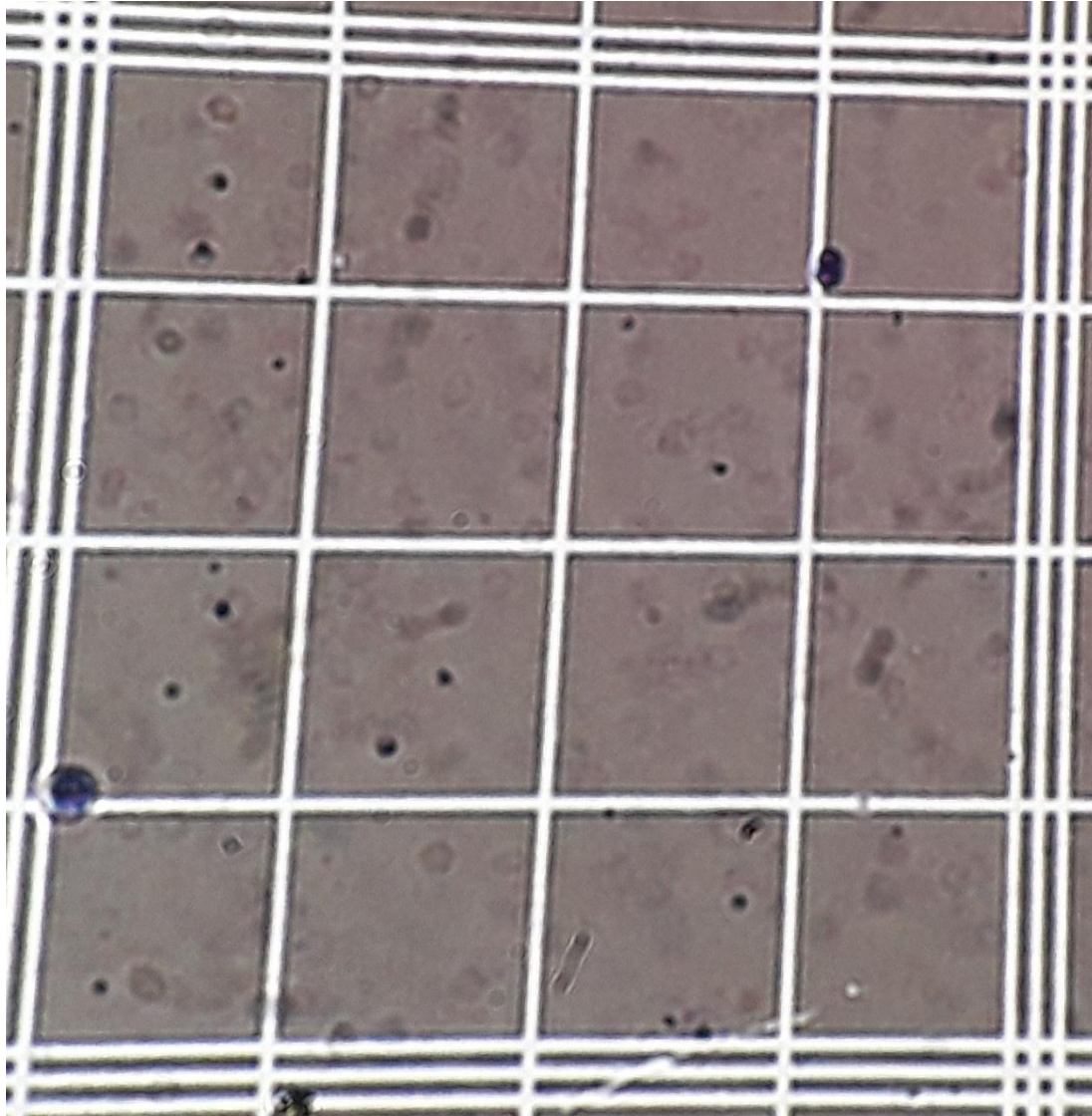
Plaquetas azules a 40x según el método "RDMP"



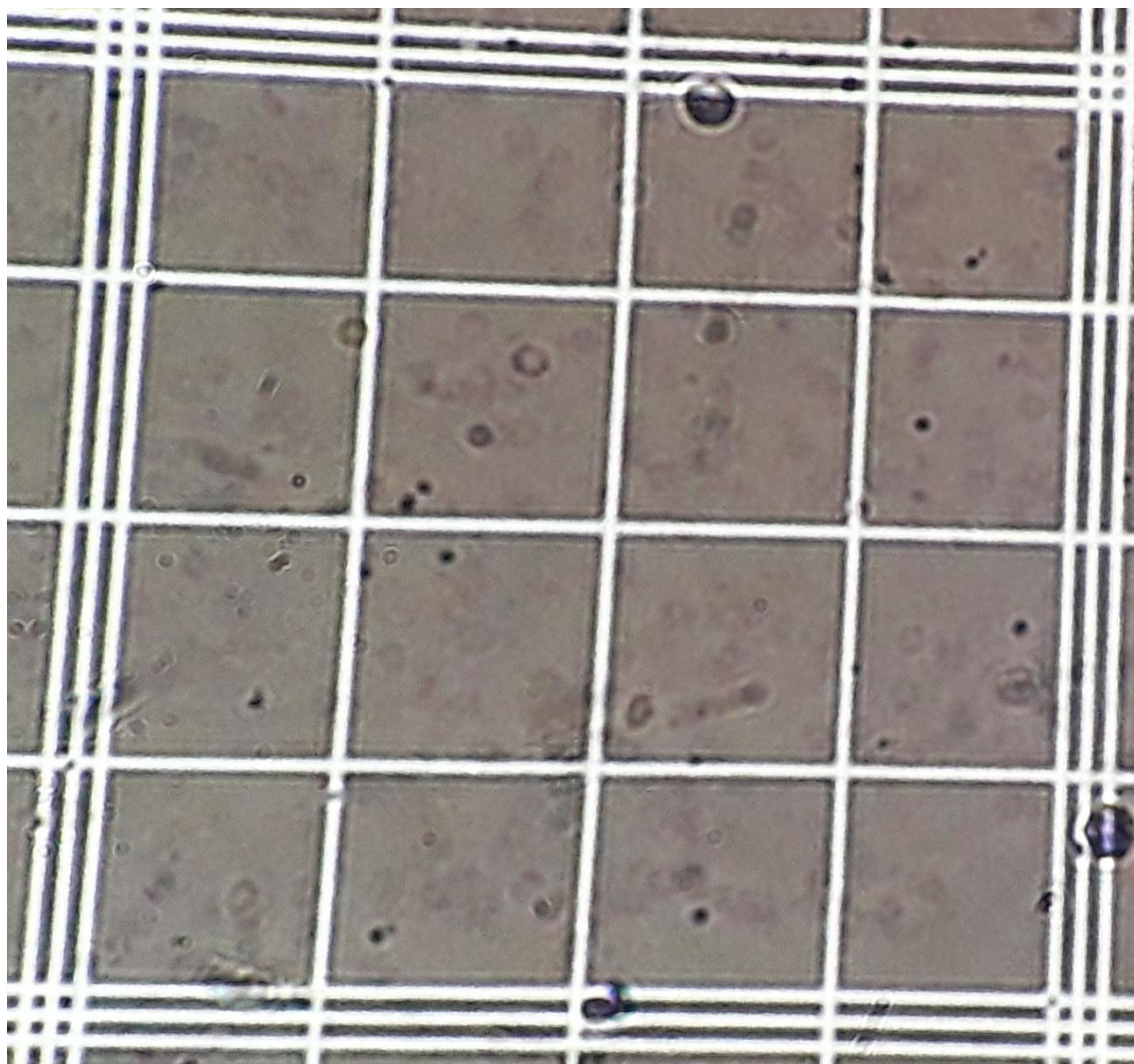
Plaquetas azules a 40x según el método "RDMP"



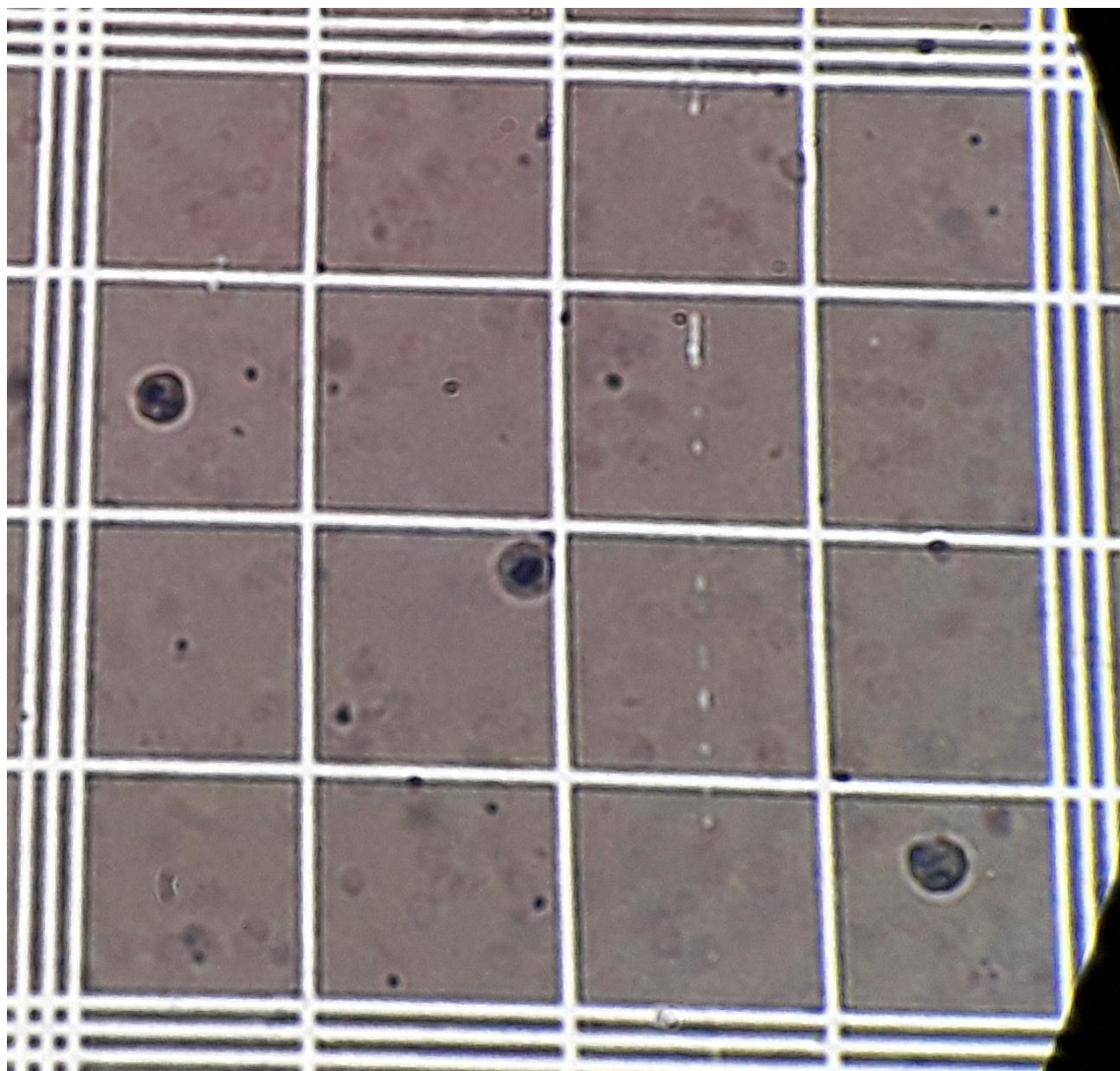
Plaquetas azules a 40x según el método "RDMP"



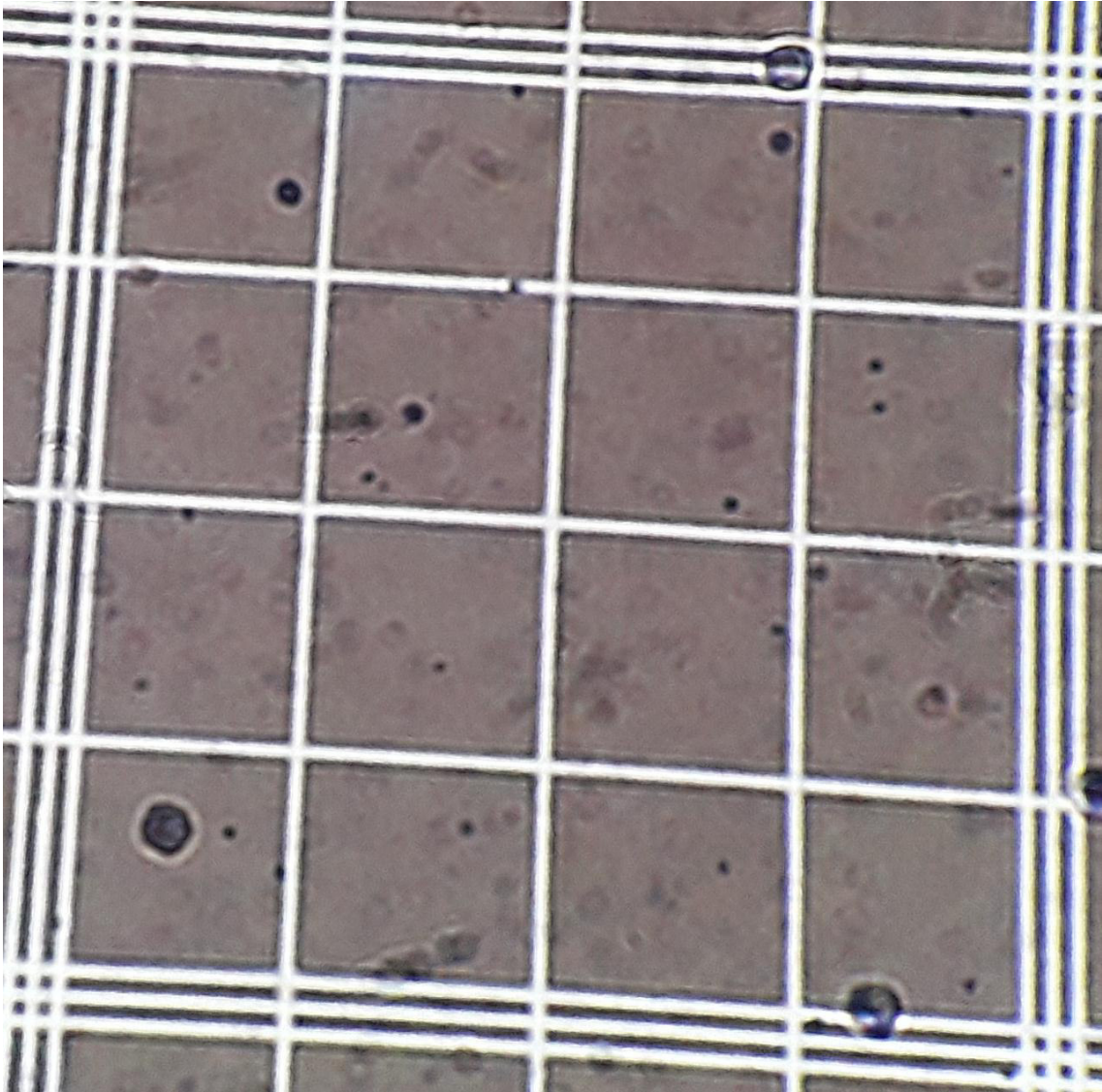
Plaquetas azules a 40x según el método "RDMP"



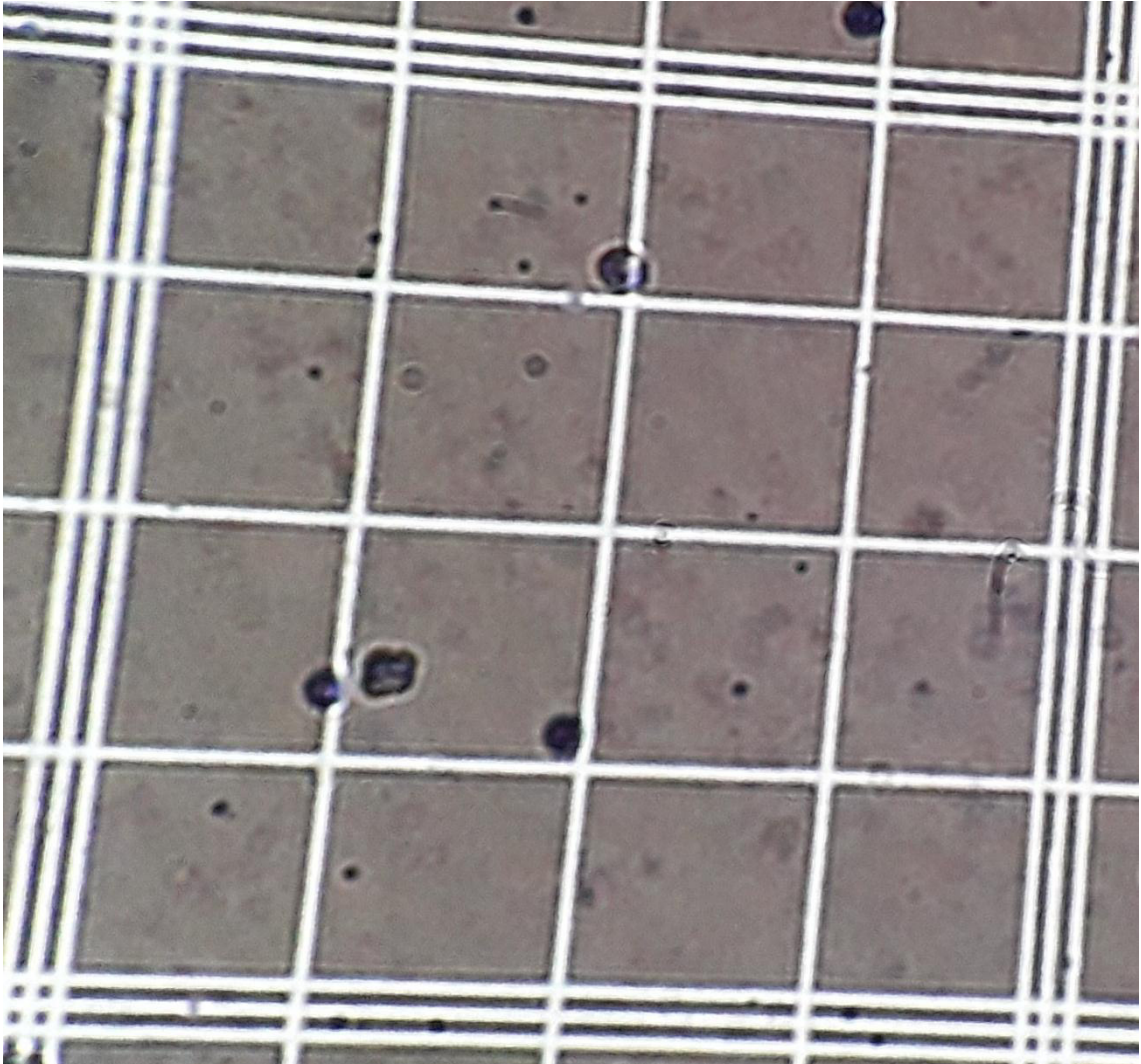
Plaquetas azules a 40x según el método "RDMP"



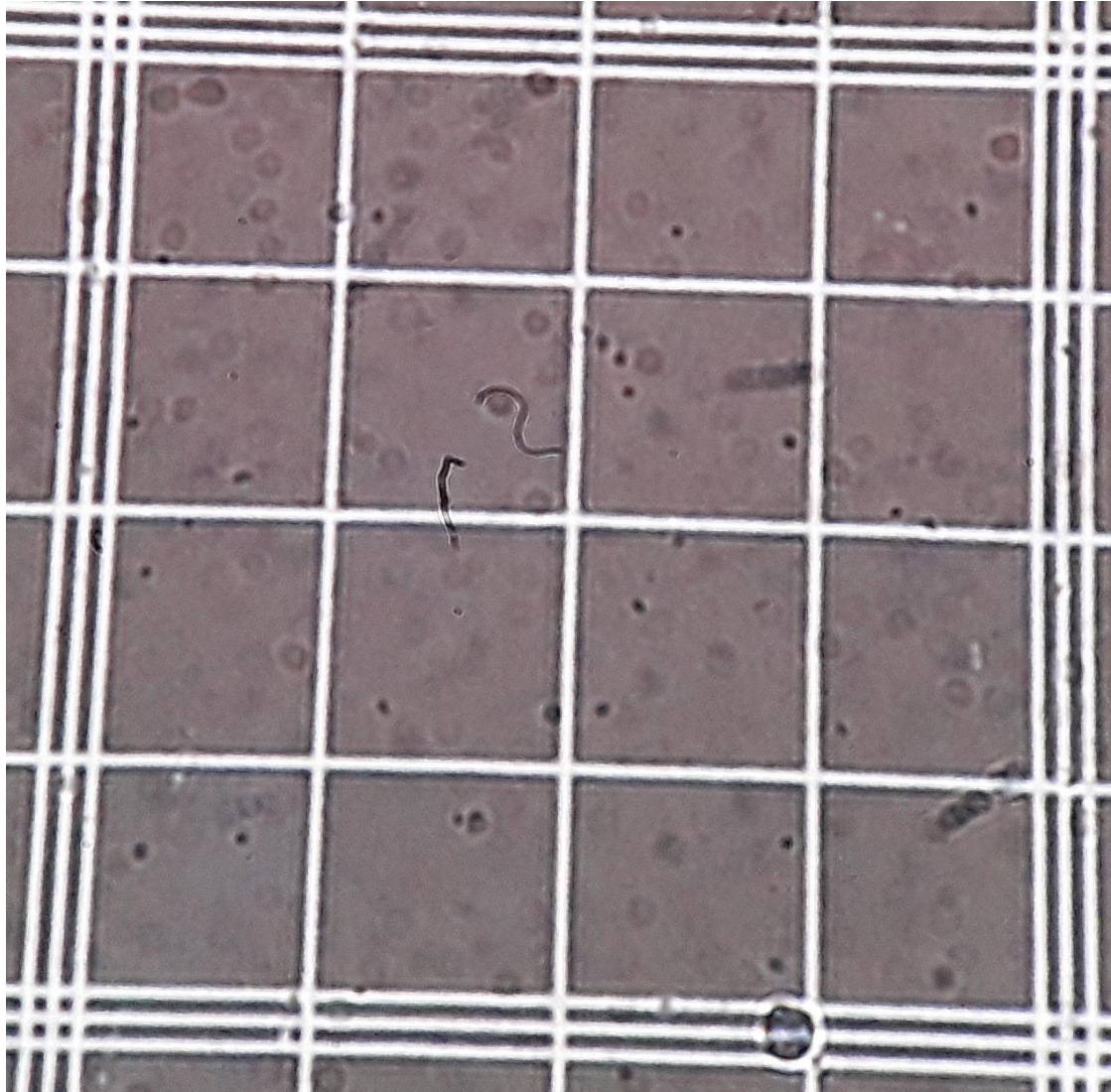
Plaquetas azules a 40x según el método "RDMP"



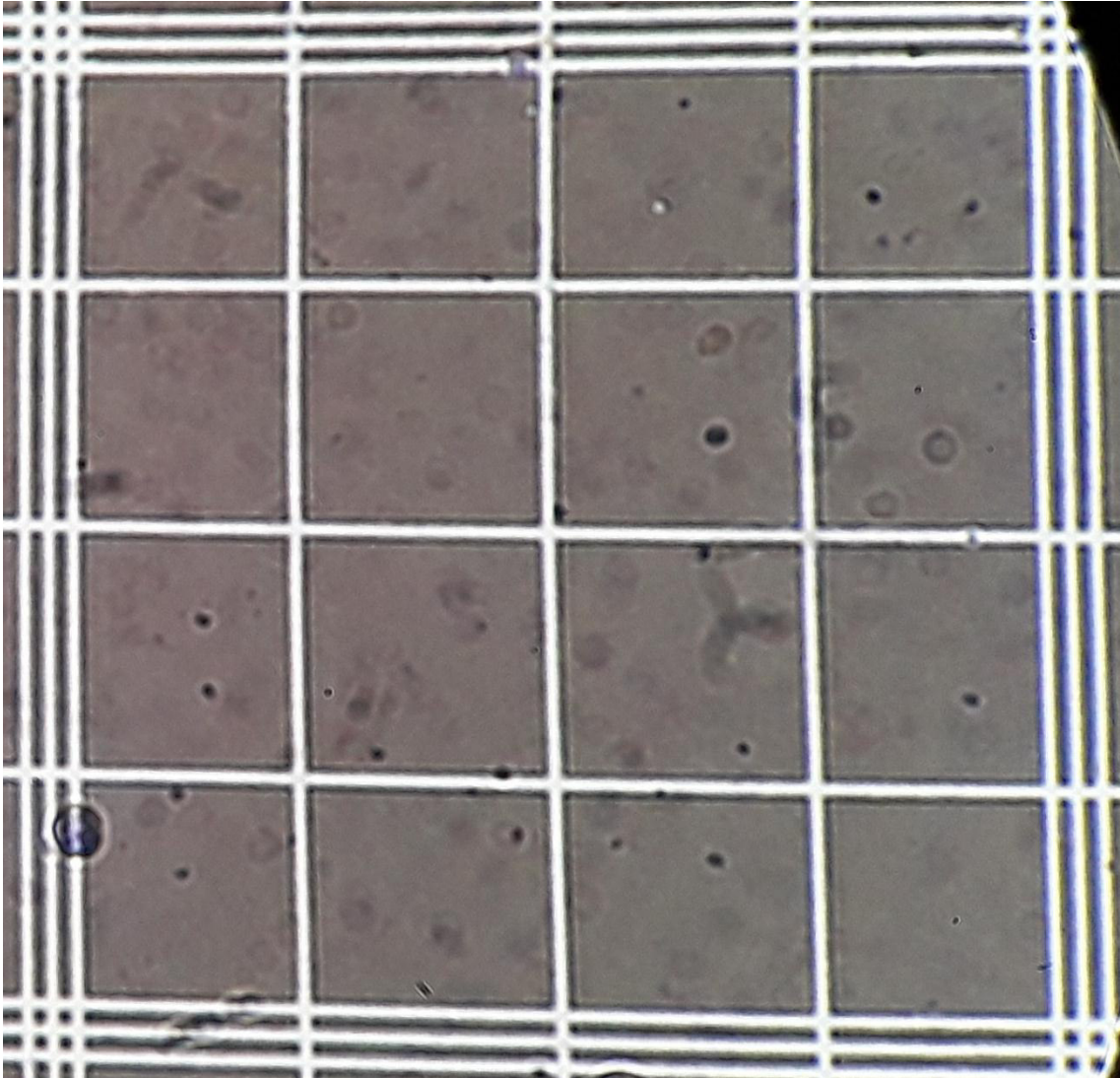
Plaquetas azules a 40x según el método "RDMP"



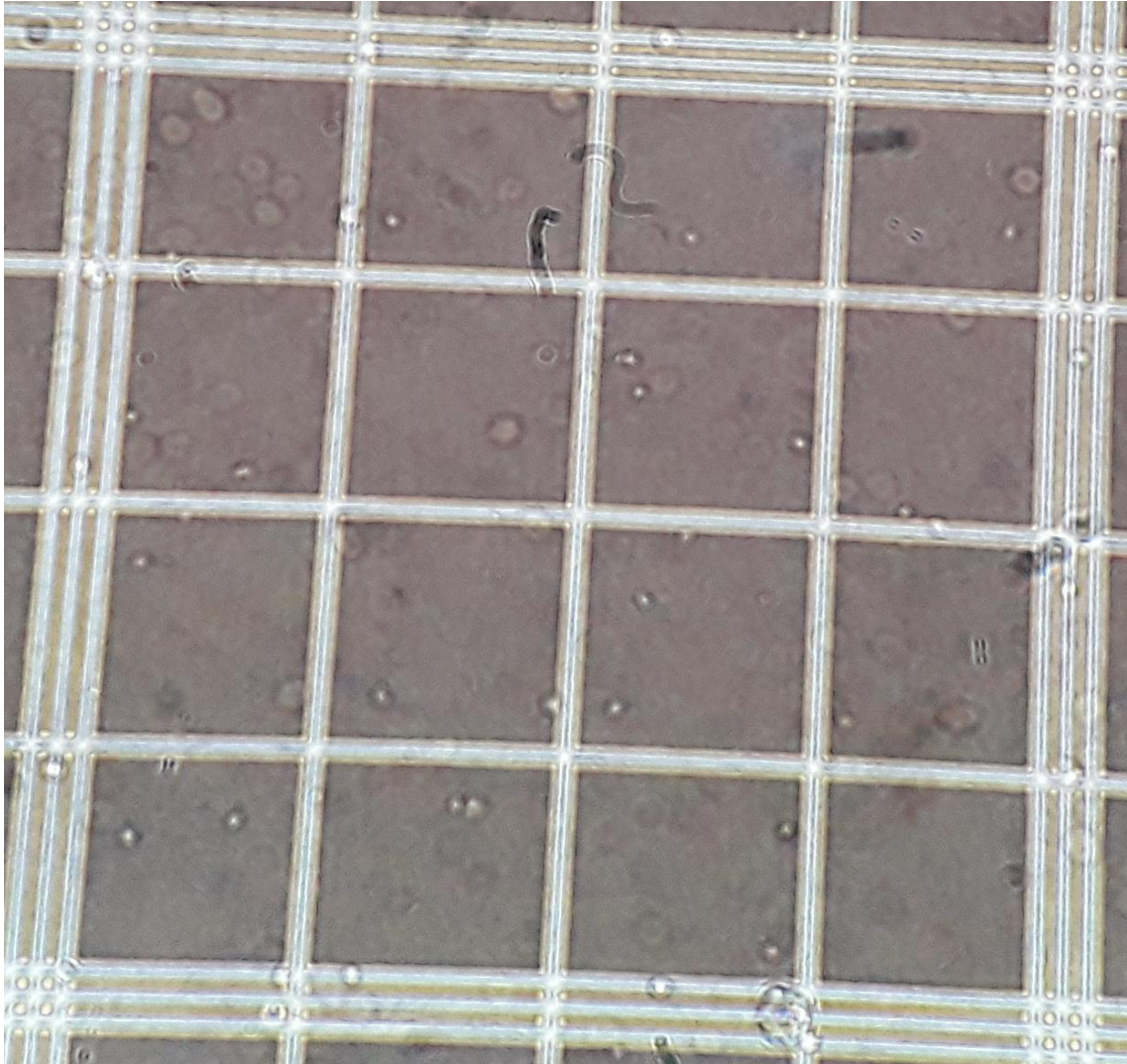
Plaquetas azules a 40x según el método "RDMP"



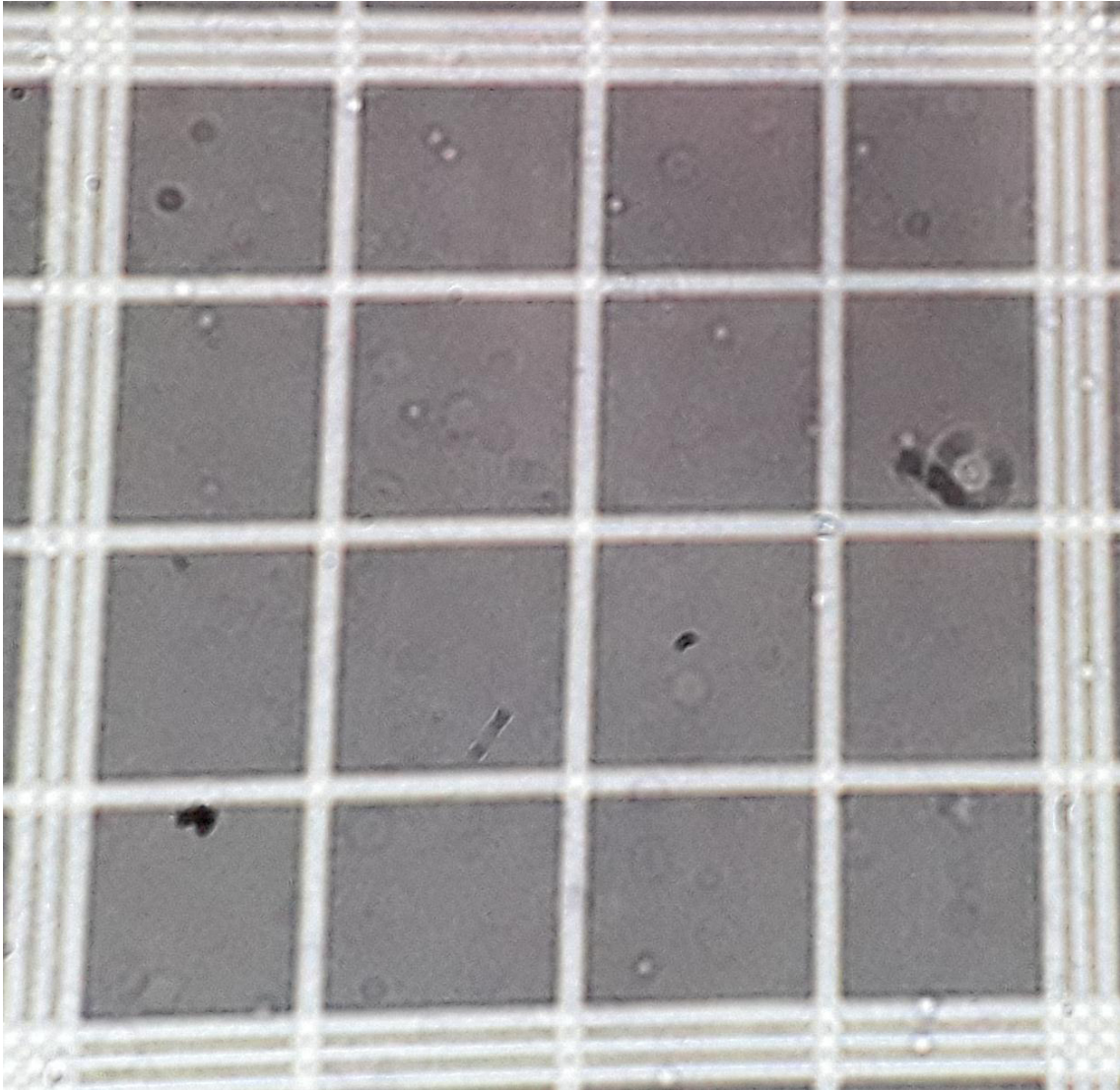
Plaquetas azules a 40x según el método "RDMP"



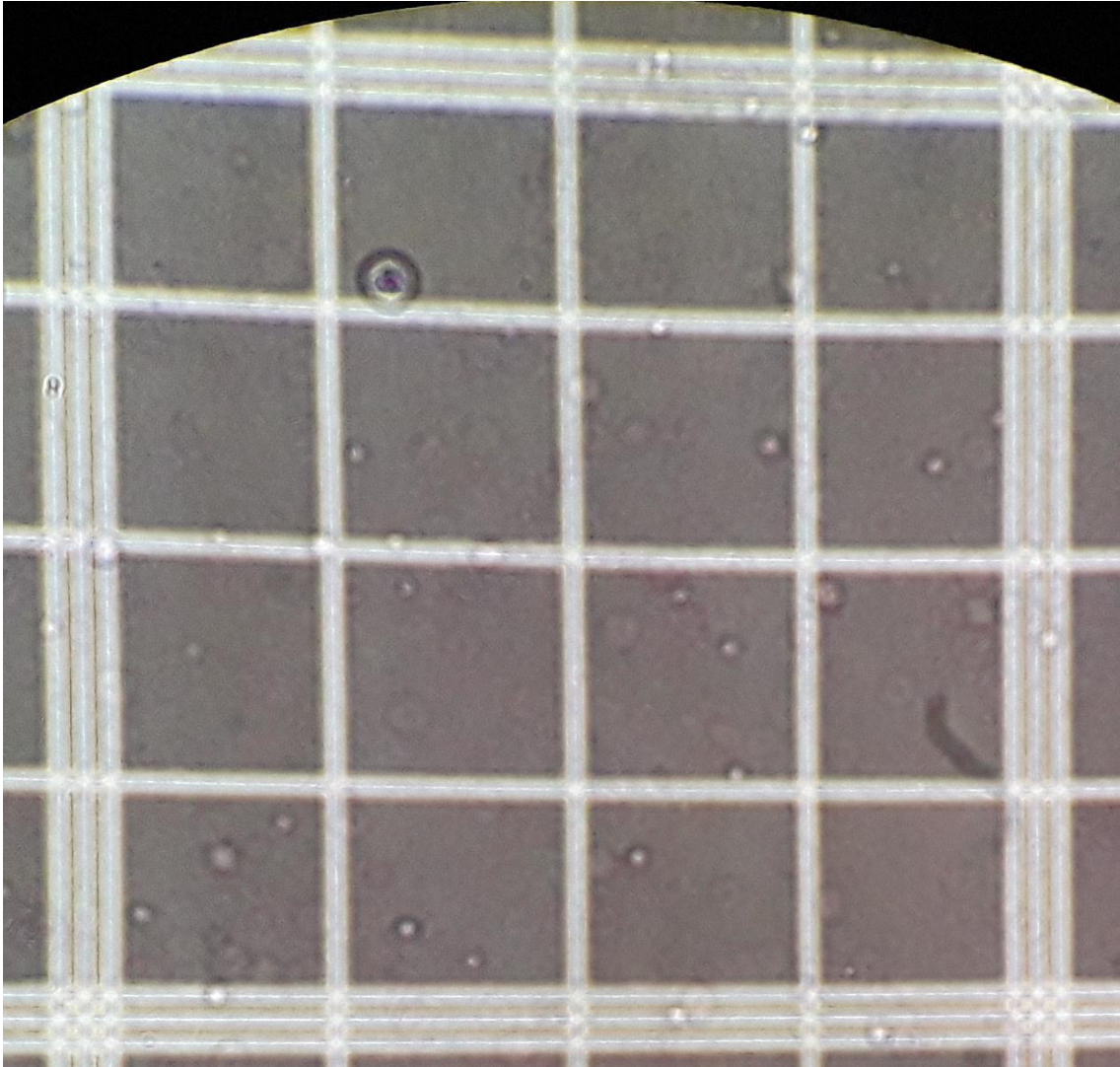
Plaquetas azules a 40x según el método "RDMP"



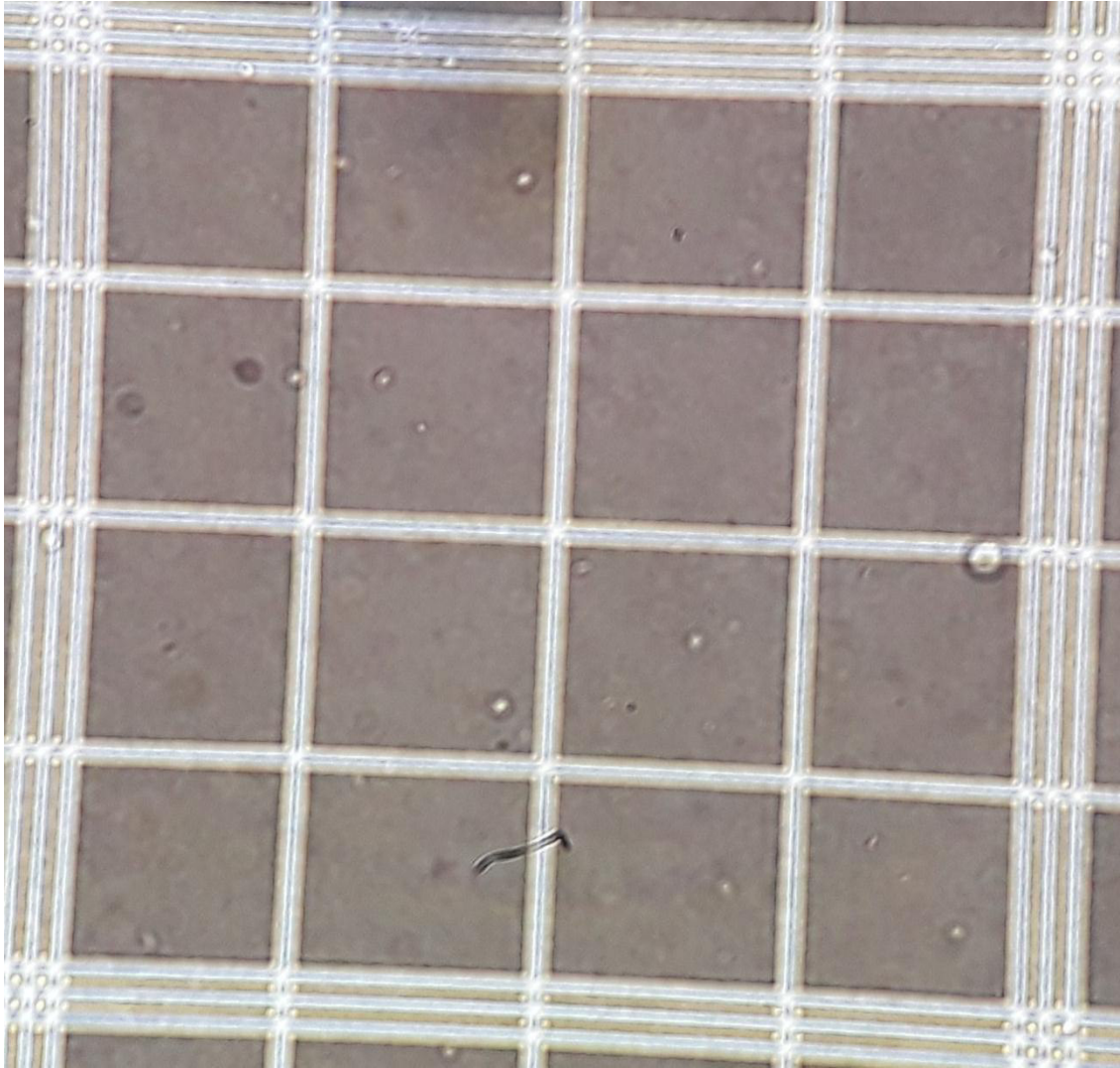
Refringencia plaquetaria a 40x según el método "RDMP"



Refringencia plaquetaria a 40x según el método "RDMP"



Refringencia plaquetaria a 40x según el método "RDMP"



Refringencia plaquetaria a 40X según el método "RDMP"

ANEXO 8

PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO DEL RECuento DIRECTO MODIFICADO DE PLAQUETAS “RDMP”

I. OBJETIVO

Este método es útil para la determinación cuantitativa de plaquetas tanto en rangos de valores normales y patológicos.

II. ALCANCE

En laboratorios no especializados, especializados y autorizados para el apoyo al diagnóstico hematológico.

III. RESPONSABILIDAD

El tecnólogo médico o profesionales afines capacitados en los laboratorios.

IV. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

- **Plaquetas:** Son fragmentos citoplasmáticos pequeños, irregulares y carentes de núcleo.
- **Recuento directo plaquetario:** Conteo de plaquetas realizado en la cámara de Neubauer.

- **Cámara de Neubauer:** Instrumento utilizado para contar partículas existentes en un líquido.

V. SIGNIFICANCIA CLÍNICA

El recuento de plaquetas está involucrado en el apoyo al diagnóstico para enfermedades relacionadas con trombocitopenias o trombocitos, además de ser importante para la realización de cirugías, transfusiones, etc.

VI. PRINCIPIO DE LA PRUEBA ANALÍTICA

Este método se basa en contar plaquetas refringentes y de color azul en cuatro cuadrantes terciarios del cuadrante secundario central en la cámara de Neubauer; posteriormente se multiplica el número total contado por un factor.

VII. REACTIVOS Y OTROS PRODUCTOS:

- Oxalato de amonio al 1%
- Azul de metileno de "HAMA"
- Papel toalla

VIII. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

El Oxalato de amonio al 1% se prepara de la siguiente manera: Diluir 1 gr de oxalato de amonio en 100 mL de agua destilada.

El azul de Metileno de "HAMA" se prepara de la siguiente forma: Diluir 1 gr de azul de metileno en 100 mL de agua destilada, agregar 1 gr de bicarbonato de sodio y mezclar durante 1 minuto, luego, llevar la solución a ebullición (100°C), una vez logrado, cronometrar 30 minutos. Finalmente, dejar enfriar la solución

a temperatura ambiente, mezclar durante 1 minuto y filtrar dos veces con papel Whatman N°2 o grado 2, la solución está lista para su uso. Si ya se cuenta con azul de metileno al 1%, sí es posible solo poder añadir bicarbonato de sodio y calentar la solución, en la cantidad y tiempo necesario para su uso, según lo especificado.

IX. CONSERVACION Y ESTABILIDAD

Si la aplicación del recuento directo se realizará diariamente, se recomienda separar una pequeña cantidad de oxalato de amonio al 1% y guardarlo en un lugar con ventilación constante y sin exponerlo a la luz. Si la frecuencia de uso no es así, se recomienda almacenarlo en refrigeración (para su dilución con sangre, esperar a que alcance la temperatura ambiental) y la solución puede ser usada mientras se mantenga transparente.

El azul de metileno de “HAMA” se conserva a temperatura ambiente y su uso es indefinido.

X. EQUIPAMIENTO

- Cámara de Neubauer “improved”
- Microscopio óptico de campo claro
- Cámara “húmeda”
- Micropipetas y tips o puntillas

XI. MUESTRA

Sangre venosa extraída con EDTA dipotásico o tripotásico con menos de cuatro horas de almacenamiento a temperatura ambiente.

XII. MODO DE OPERACIÓN

- 1.** Se realiza una dilución, previa homogenización de la muestra sanguínea, con oxalato de amonio al 1% (mover esta solución antes de su uso por unos breves segundos también), en tubos de plástico de 12x75 mm (no se debe usar vidrio debido a que las plaquetas pueden adherirse a las paredes del tubo), de tal manera que por cada 20 uL de sangre, se debe agregar 870 uL de oxalato de amonio al 1%. Limpiar el exceso de sangre en la superficie del tip o puntilla con un pedazo de papel toalla antes de mezclar con el oxalato de amonio al 1%.
- 2.** Luego, se homogeniza la mezcla mediante el uso de una micropipeta (fijada a 870 uL) o mediante el uso de parafilm durante 20 segundos y se dejó reposar el tubo a temperatura ambiente por 15 minutos.
- 3.** Se agrega 30 uL del azul de metileno de "HAMA" y se mezcla 5 veces mediante el uso de una micropipeta o mediante el uso de parafilm. Inmediatamente después, se mide 20 uL de la solución total (limpiar brevemente el exceso en la superficie del tip o puntilla con un pedazo de papel toalla), se carga en un sólo lado de la cámara de Neubauer (deberá sobrar muy poco de solución en el tip) y se deja reposar en una placa Petri de vidrio o plástico con un pequeño trozo de algodón húmedo o un pedazo de papel filtro húmedo por 5 minutos, para permitir la sedimentación de plaquetas.
- 4.** Finalmente, el recuento se realiza mediante un microscopio óptico de campo claro, a 40X, el condensador totalmente abajo, el diafragma semicerrado o casi cerrado por completo y en la zona de recuento de hematíes (cuadrante secundario central), con excepción del cuadrante terciario central (solo 4 cuadrantes, superior izquierda y derecha; inferior derecha e izquierda). Las plaquetas se pueden diferenciar de otros elementos debido a su color azul, refringencia y forma circular u oval. El número de plaquetas total contadas se multiplicó por 2875, dando como resultado el número de plaquetas/uL de sangre.

XIII. MODO DE RECUENTO

Para que las células que están encima o cerca de las líneas de limitación, no se cuenten dos veces o se olviden en el recuento, se siguen las siguientes reglas:

- Se cuentan todas las células que se encuentran dentro de una definida zona de medición, siguiendo una determinada dirección. **Figura 1**
- También se cuentan las células (marcadas en negro) que tocan o están encima de 2 líneas a un lado (en la línea de medida izquierda y superior). **Figura 2**

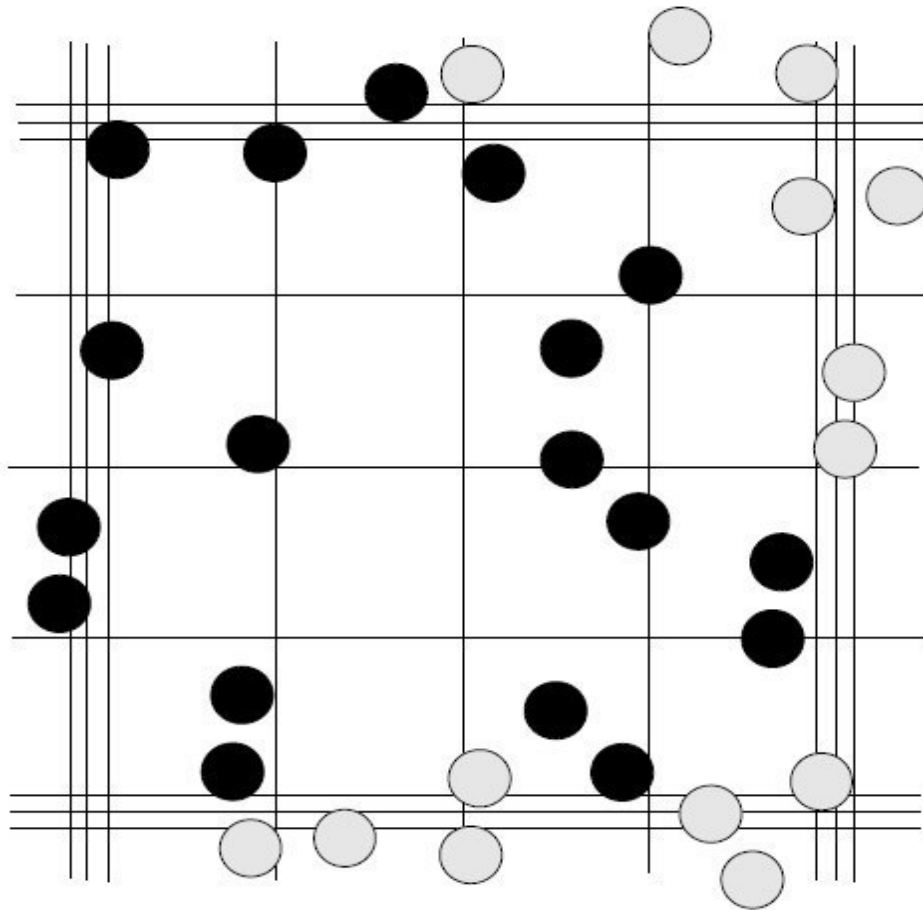


Figura 2. Sólo las células que tocan o están encima de 2 líneas en los lados superior e izquierdo (en negro), deben ser contadas.

XIV. RESULTADOS ANALÍTICOS

➤ RANGO DE VALORES A INFORMAR

Mediante este factor el rango de valores a informar será entre 143 750 y 575 00 plaquetas por uL de sangre. Para rangos inferiores o superiores, se deberán utilizar otros factores detallados en la sección de rangos de alarma.

➤ **RANGOS DE ALARMA**

- Si en la cámara de Neubauer, se cuentan menos de 50 plaquetas en total, se debe modificar el método con el uso de las siguientes proporciones: por cada 20 uL de sangre, agregar 425 uL de oxalato de amonio al 1% y 15 uL de Azul de Metileno de "HAMA" en sus pasos respectivos. El paso "2" aumenta hacia 20 minutos, todos los demás se mantienen igual. El número de plaquetas total contadas se debe multiplicar por 1437, dando como resultado el número de plaquetas/uL de sangre.
- Si en la cámara de Neubauer, se cuentan más de 200 plaquetas en total, se debe modificar el método con el uso de las siguientes proporciones: por cada 20 uL de sangre, agregar 1760 uL de oxalato de amonio al 1% y 60 uL de Azul de metileno de "HAMA" en sus pasos respectivos. Todos los demás pasos se mantienen sin ninguna variante. El número de plaquetas total contadas se debe multiplicar por 5750, dando como resultado el número de plaquetas/uL de sangre.

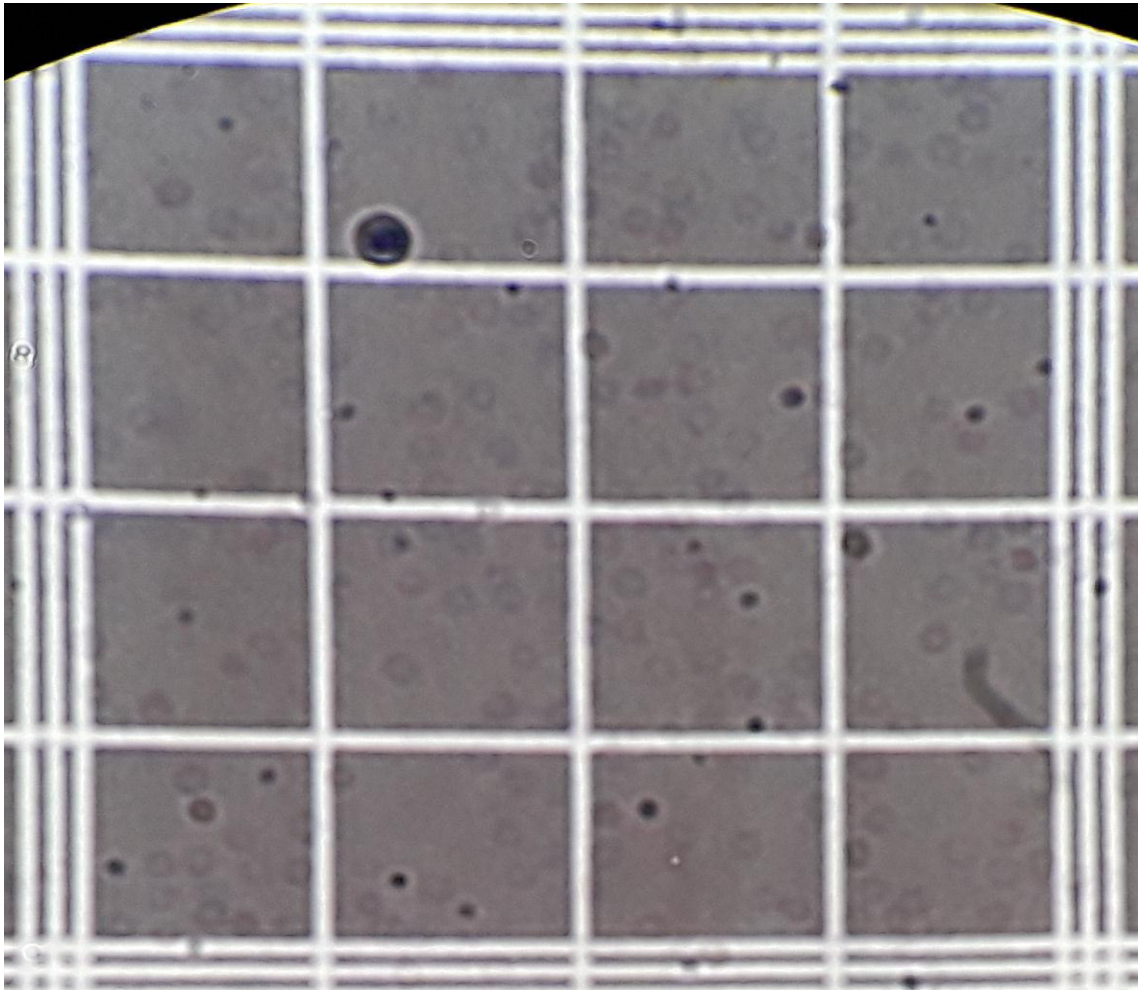
➤ **INTERVALOS DE REFERENCIA:**

Los rangos normales de plaquetas se encuentran entre 150 mil y 450 mil plaquetas por uL de sangre.

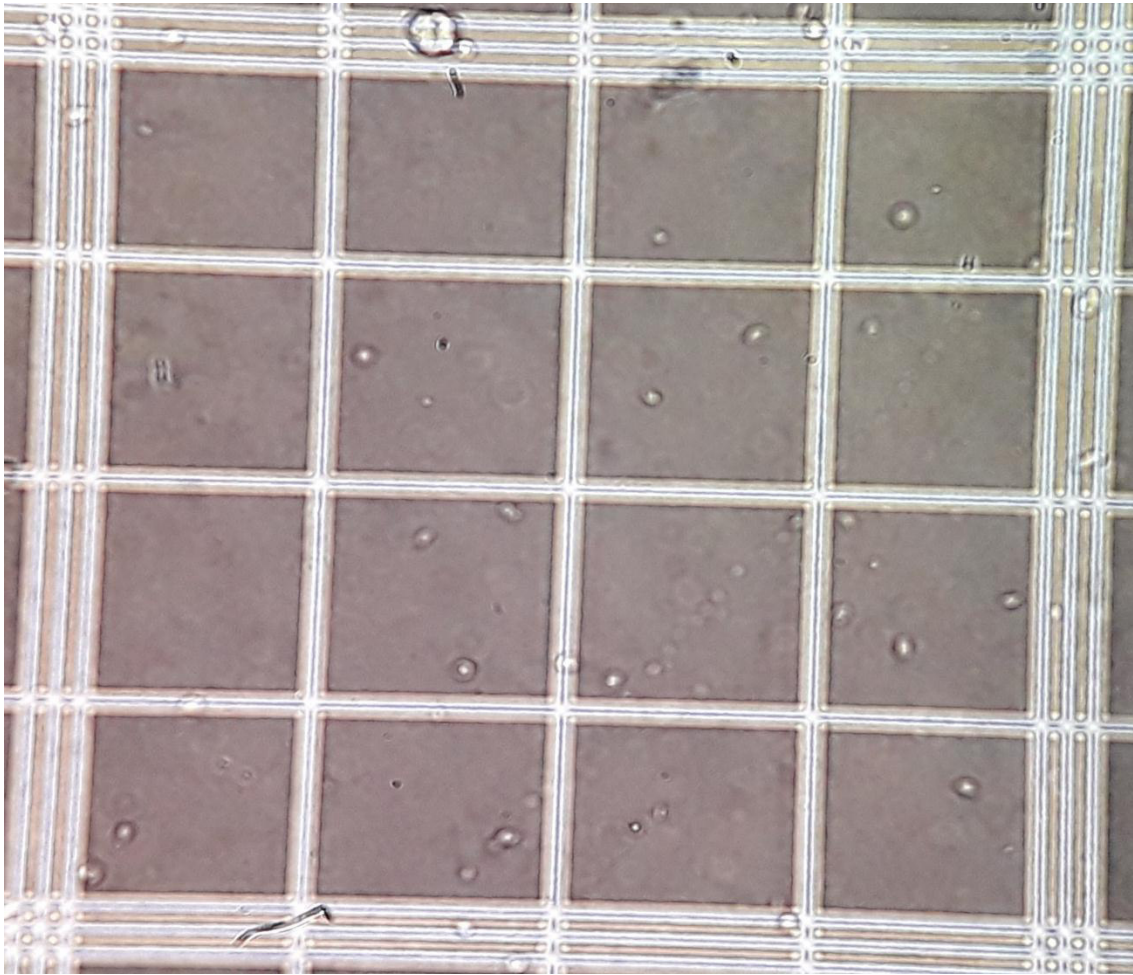
XV. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

Ramirez G. Utilidad del azul de metileno para el recuento de plaquetas en la cámara de Neubauer [tesis]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina; 2018.

XVI. ANEXOS



Plaquetas observadas de color azul a 40X en el cuadrante terciario superior izquierdo de la zona de recuento de plaquetas del método "RDMP"



Refringencia plaquetaria a 40X en el cuadrante terciario inferior derecho de la zona de recuento de plaquetas del método "RDMP"

ANEXO 9

El Recuento indirecto mediante lámina periférica tuvo el siguiente protocolo:

1. A partir de una muestra sanguínea recolectada con EDTA dipotásico o tripotásico y que cumplió con los demás criterios de inclusión, se procedió a homogenizar 10 veces el tubo y se realizó un frotis sanguíneo.
2. Se dejó secar el frotis sanguíneo y se realizó una coloración Wright.
3. Se realizó la lectura con el objetivo de 100X. El recuento se realizó en la zona de monocapa celular del frotis sanguíneo: El número de eritrocitos observados en un cuarto de campo se multiplicó por 4 y se contaron todas las plaquetas en el mismo campo. Se procedió a observar otros campos hasta llegar a un mínimo de 1000 hematíes. Finalmente, el número total de plaquetas por 1000 hematíes fue multiplicado por el número del recuento automatizado de hematíes para dar el número de plaquetas total ($\times 10^3/\mu\text{L}$).

ANEXO 10



NOTA INFORMATIVA N°271-SPC-HONADOMANI-SB-2018

ASUNTO: PROYECTO DE TESIS

**A : ALUMNO INTERNO T.M. DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Sr. GIAN CARLOS RAMIREZ UBILLUS**

FECHA : 22 de Mayo 2018.

Es grato dirigirme a usted para saludarle cordialmente, esta Jefatura de Servicio da el visto bueno de aprobación al proyecto de tesis titulado "Utilidad del azul de metileno para el recuento de plaquetas en la cámara de Neubauer" por usted presentado.

Agradezco su atención al presente, me despido de usted reiterándole los sentimientos de mi mayor estima.

Atentamente,

C.c.- Dra. Diaz
Dra. B. Rodríguez

MINISTERIO DE SALUD
HONADOMANI "SAN BARTOLOME"
JORGE MANUEL LEIVA BERAUN
MEDICO PATOLOGO CLINICO
C.M.P. 13731 R.N.E. 5702
JEFE DEL SERVICIO DE PATOLOGIA CLINICA

ANEXO 11



PERU

Ministerio de
Salud

Hospital Nacional Docente
Madre Niño "San Bartolomé"

Oficina de Apoyo a la
Docencia e Investigación

Lima, 02 de julio de 2018

OFICIO N° 0388-2018-OADI-HONADOMANI-SB

GIAN CARLOS RAMIREZ UBILLUS

Investigador Principal

Presente. –

Exp. N° 07532-18

Tengo el agrado de dirigirme a usted para saludarlo cordialmente y en relación al Proyecto de Tesis titulado:

"UTILIDAD DEL AZUL DE METILENO PARA EL RECUENTO DE PLAQUETAS EN LA CÁMARA DE NEUBAUER".

Al respecto se informa lo siguiente:

- La observación ha sido levantada correctamente.
- El planteamiento del estudio y la metodología propuesta para la evaluación de los resultados son apropiados para el estudio.

Conclusión

El proyecto con Expediente N°07532-18. El proyecto está aprobado por el Comité de Ética Institucional e Investigación de manera expedita.

Nos es propicia la oportunidad para renovar los sentimientos de nuestra consideración y estima personal.

Atentamente,

MINISTERIO DE SALUD
HOSPITAL NACIONAL DOCENTE MADRE NIÑO
SAN BARTOLOMÉ

M.C. HUGO DELGADO BARTRA
Jefe de Apoyo a la Docencia e Investigación

HDB/vma
cc.archivo

ANEXO 12



COTIZACION BIOSIX IMPORT SAC

COTIZACION N° 240918-1

24/09/2018

SR. GIAN CARLOS RAMIREZ UBILLUS

Ha solicitado información sobre los precios de nuestra compañía. A continuación aparecen nuestros precios:

CODIGO	DESCRIPCION	MARCA	PROCEDENCIA	CANTIDAD	UM	PRECIO UNIT.	PRECIO TOTAL	OBSERVACIONES
	OXALATO DE AMONIO EN SOLIDO	FERMONT	MEXICO	1	UND	S/. 254.00	S/. 254.00	FRASCO X 500 GR
	SOLUCION OXALATO DE AMONIO	STAINLAB	PERU	1	UND	S/. 25.80	S/. 25.80	FRASCO X 1LT
	AZUL DE METILENO	LOBA CHEMIE	INDIA	1	UND	S/. 145.00	S/. 145.00	FRASCO X 100 GR
	SOLUCION AZUL DE METINLENO	STAINLAB	PERU	1	UND	S/. 21.70	S/. 21.70	FRASCO X 1 LT
	BICARBONATO DE SODIO	FERMONT	MEXICO	1	UND	S/. 72.00	S/. 72.00	FCO X 500 GR

TIEMPO DE ENTREGA : 7 DIAS

VALIDEZ DE OFERTA : 15 DIAS

PRECIOS INCLUEN IGV DE LEY

FORMA DE PAGO: TRANSFERENCIA / DEPOSITO

FORMA DE ENTREGA: FLETE PAGO EN DESTINO POR EL CLIENTE

GARANTIA : 1 AÑO

NOTA

PARA COMPRAS MENORES A S/800.00 SIRVASE RECOGER LA MERCADERIA EN NUESTRAS INSTALACIONES

El precio del flete y la instalacion se ven sujetos al lugar de entrega

No aceptamos devoluciones de productos fiscalizados

Los envios a provincia se ven sujetos ala disponibilidad del transporte

La cotizacion no significa la separacion de la mercaderia

El tiempo de entrega en dias calendario , una vez recibida la orden de compra

Numero de cuenta BCP S/. 191-20486740-75

Atentame

Israel Ramirez Vera
Representante

RUC 20554258094
Pasaje Loma de las Petunias N° 170 Santiago de Surco
Teléfono: (01) 329-9675 / 480-9171
e-mail: ventas@biosix.com.pe / jesus.ramirez@biosix.com.pe



ANEXO 13: MATRIZ DE CONSISTENCIA

Título: Utilidad del azul de metileno para el recuento de plaquetas en la cámara de Neubauer

Problemas: Principal	Objetivos	Hipótesis	Variables e Indicadores	Diseño Metodológico
<p>• ¿Cuál es la utilidad del azul de metileno para el recuento de plaquetas en la cámara de Neubauer?</p> <p>Problemas Secundarios</p> <ul style="list-style-type: none"> • ¿Cuál es el rango de coeficientes de variación interobservador de los resultados reportados con azul de metileno para el recuento de plaquetas en la cámara de Neubauer? • ¿Cuál es el grado de diferencia o similitud entre los recuentos plaquetarios realizados por las diferentes metodologías? • ¿Cuál es grado de correlación, concordancia y significancia clínica por las diferentes metodologías empleadas? • ¿Cómo se observarán las plaquetas en la cámara de Neubauer? 	<p>Objetivo General</p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluar la utilidad del azul de metileno para el recuento plaquetario en la cámara de Neubauer <p>Objetivos Específicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Determinar el rango de coeficientes de variación interobservador en los resultados reportados con azul de metileno para el recuento de plaquetas en la cámara de Neubauer. • Comparar los recuentos plaquetarios generados por las diferentes metodologías empleadas. • Determinar el grado de correlación, concordancia y significancia clínica generadas por las diferentes metodologías empleadas. • Demostrar que las plaquetas se observan refringentes y de color azul en la cámara de Neubauer. 	<p>General</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sí, el azul de metileno será útil para el recuento de plaquetas en la cámara de Neubauer <p>Específicas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sí, se determinará el rango de coeficientes de variación interobservador de los resultados reportados con azul de metileno para el recuento de plaquetas en la cámara de Neubauer. • Sí, se compararán los recuentos plaquetarios generados por las diferentes metodologías. • Sí, se determinará el grado de correlación, concordancia y significancia clínica por las diferentes metodologías empleadas. • Sí, las plaquetas se observarán de azules y refringentes en la cámara de Neubauer. 	<p>El estudio es descriptivo y la relación de las variables es asociativa, por lo tanto, forman parte del estudio.</p>	<p>Diseño Metodológico</p> <p>Metodología Según el enfoque metodológico es cuantitativo, según el nivel es aplicada, de tipo descriptivo y método comparativo.</p> <p>Población La población está integrada por 150 pacientes que asisten al referido hospital para realizarse un examen hematológico de laboratorio.</p> <p>Área de estudio El estudio se realizará en los laboratorios de Hematología y Emergencias del Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé, que se encuentra ubicado en la siguiente dirección: Avenida Alfonso Ugarte 825, distrito de Cercado de Lima, provincia de Lima, departamento de Lima.</p> <p>Muestra Está conformado por 59 muestras de sangre venosa extraídas con EDTA.</p> <p>Tipo de Muestreo Probabilístico de tipo aleatorio simple.</p> <p>Técnicas Observación y evaluación de la coloración.</p> <p>Instrumentos Ficha de recolección de datos.</p>

