



**Universidad
Norbert Wiener**

Facultad de Ciencias de la Salud

**“Evaluación de 3 métodos indirectos para el recuento
estimado de plaquetas en frotis de sangre periférica Lima-
Perú, 2022”**

Trabajo académico para optar el título de especialista en
Hematología

Autor:


**LIC. T.M. Conde Sanabria, Ricardo
CÓDIGO ORCID: 0000-0002-0390-2929**

Asesor:

**Mg. Huamán Cárdenas, Víctor Raúl
CÓDIGO ORCID: 0000-0002-6371-4559**

LIMA – PERÚ

2022

 Universidad Norbert Wiener	DECLARACIÓN JURADA DE AUTORIA Y DE ORIGINALIDAD DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN		
	CÓDIGO: UPNW-GRA-FOR-033	VERSIÓN: 01 REVISIÓN: 01	FECHA: 08/11/2022

Yo, Ricardo Conde Sanabria egresado de la Facultad de Ciencias de la Salud y Escuela Académica Profesional de Tecnología Médica / Escuela de Posgrado de la Universidad privada Norbert Wiener declaro que el trabajo académico “EVALUACIÓN DE 3 MÉTODOS INDIRECTOS PARA EL RECuento ESTIMADO DE PLAQUETAS EN FROTIS DE SANGRE PERIFÉRICA LIMA – PERÚ, 2022” Asesorado por el docente: Msc. Víctor Raúl Huamán Cárdenas DNI 70092305 ORCID 0000-0002-6371-4559 tiene un índice de similitud del 11 % , once % con código 14912:238800618 verificable en el reporte de originalidad del software Turnitin.

Así mismo:

1. Se ha mencionado todas las fuentes utilizadas, identificando correctamente las citas textuales o paráfrasis provenientes de otras fuentes.
2. No he utilizado ninguna otra fuente distinta de aquella señalada en el trabajo.
3. Se autoriza que el trabajo puede ser revisado en búsqueda de plagios.
4. El porcentaje señalado es el mismo que arrojó al momento de indexar, grabar o hacer el depósito en el turnitin de la universidad y,
5. Asumimos la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión en la información aportada, por lo cual nos sometemos a lo dispuesto en las normas del reglamento vigente de la universidad.



Firma de autor
 Ricardo Conde Sanabria
 DNI: 46258783



Huella



Firma del Asesor
 Msc. Víctor Raúl Huamán Cárdenas
 DNI: 70092305



Huella

Lima, 7 de junio del 2023

ÍNDICE

RESUMEN

1. EL PROBLEMA

- 1.1. Planteamiento del problema
- 1.2. Formulación del problema
 - 1.2.1. Problema general
 - 1.2.2. Problemas específicos
- 1.3. Objetivos de la investigación
 - 1.3.1. Objetivo general
 - 1.3.2. Objetivos Específicos
- 1.4. Justificación de la investigación
 - 1.4.1. Teórica
 - 1.4.2. Metodológica
 - 1.4.3. Práctica
- 1.5. Delimitación de la investigación
 - 1.5.1. Temporal
 - 1.5.2. Espacial
 - 1.5.3. Recursos

2. MARCO TEÓRICO

- 2.1. Antecedentes
- 2.2. Bases Teóricas
- 2.3. Formulación de hipótesis
 - 2.3.1. Hipótesis General
 - 2.3.2. Hipótesis Específicas

3. METODOLOGÍA

- 3.1. Método de la investigación
- 3.2. Enfoque de la investigación
- 3.3. Tipo de investigación
- 3.4. Diseño de investigación
- 3.5. Población, muestra y muestreo
- 3.6. Variables y operacionalización

3.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.7.1. Técnica

3.7.2. Descripción de instrumentos

3.7.3. Validación

3.7.4. Confiabilidad

3.8. Plan de procesamiento y análisis de datos

3.9. Aspectos éticos

4. ASPECTOS ADMINISTRATIVOS

4.1. Cronograma de actividades

4.2. Presupuesto

5. REFERENCIAS

6. ANEXOS

6.1. Matriz de consistencia

RESUMEN

La imprecisión en el recuento de plaquetas en los equipos automatizados en casos de trombocitopenias o en ciertos casos de trombocitosis, puede causar alteraciones en su variabilidad debido a las limitaciones que pueda tener la metodología. Ante la presencia de Flags o alertas en los analizadores hematológicos, se sigue aplicando en la actualidad su verificación mediante un frotis de sangre periférica, donde podemos observar alteraciones cualitativas y cuantitativas de las tres líneas celulares sanguíneas. En Lima Metropolitana y Callao los Tecnólogos Médicos en Laboratorio Clínico que realizan recuento estimado de plaquetas en frotis sanguíneo ante evidencia de una alarma de plaquetas en sus equipos, utilizan diferentes métodos indirectos que se basan a parámetros por campo o índices eritrocitarios, entre ellos: El Método factor 20 000, Método de Fonio, Método de Dameshek, entre otros muy poco frecuentes. **Objetivo:** Evaluar la diferencia entre los 3 métodos indirectos para recuento estimado de plaquetas en comparación con el gold estándar en frotis de sangre periférica. **Materiales y métodos:** El método de investigación es hipotético deductivo, de tipo aplicada, con enfoque cuantitativo y diseño experimental de estudio diagnóstico.

Palabras claves: Plaquetas, Recuento indirecto de plaquetas, variabilidad analítica.

1. EL PROBLEMA

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El hemograma a nivel mundial es una de las pruebas que mayor solicitud tiene en el laboratorio clínico y es uno de los análisis que más información aporta al clínico, porque brinda una visión global de la homeostasis del individuo. De ahí la importancia de que se evalúen el mayor número de parámetros y, sobre todo sus modificaciones para mejorar su precisión y exactitud posible, obteniendo analizadores hematológicos robustos que brinden un resultado mucho más confiable y el tratamiento rápido para el paciente. ^(1,2)

Al no existir en la actualidad un método de referencia real para el conteo de plaquetas, el comité de expertos en citometría del ICSH (El consejo Internacional de Normalización en Hematología) recomendó algunos métodos que incluyen: la microscopía de contraste de fase en hemocitómetro con oxalato de amonio y la determinación de la relación Glóbulos Rojos / Plaquetas (PLT) medida con un contador por impedancia directa con una corriente de flujo con enfoque hidrodinámico (recuento indirecto de plaquetas). ⁽³⁾

Los analizadores hematológicos tienen un coeficiente de variación (CV) bajo, en los instrumentos de primera generación en un 4.0 % y los autoanalizadores de última generación un inferior al 1% para el recuento de plaquetas en base a sus diferentes metodologías que se conocen actualmente. ⁽²⁾

La imprecisión en el recuento de plaquetas en los equipos automatizados en casos de trombocitopenias o en ciertos casos de trombocitosis, puede causar un aumento en su variabilidad debido a las limitaciones que pueda tener la metodología, por ejemplo, el poder diferenciar las plaquetas de otras partículas y/o células de igual tamaño. Esto puede dar como resultado en un recuento espúreo de plaquetas, que puede ser incrementado o disminuido. ⁽⁴⁾

Es por ello que, ante la presencia de los Flags o alertas en los analizadores hematológicos, se sigue aplicando en la actualidad su verificación mediante un frotis de sangre periférica, donde podemos observar alteraciones cualitativas y cuantitativas de las tres líneas celulares sanguíneas. Por ejemplo, al realizar un recuento estimado de plaquetas se puede descartar posibles pseudotrombocitopenias y al evaluar la morfología se podría hallar alteraciones asociadas a diversas patologías tales como el síndrome de Bernard-Soulier, síndrome de Wiskott-Aldrich y la anomalía de May-Hegglin, teniendo en consideración que para un frotis de sanguíneo se requiere de un buen extendido, una óptima coloración para que el analista según su capacidad, habilidad y entrenamiento brinde información confiable en el reporte.⁽⁵⁾

El método de estimación de plaquetas en frotis de sangre periférica es rápido, barato y fácil y no necesita de materiales costosos. Tarda aprox. 30 min. En centros de salud donde no se dispone de métodos o equipamientos avanzados, la estimación de plaquetas en frotis sanguíneo es considerado una herramienta fundamental en la evaluación de pacientes con trastornos hematológicos, agregando información útil a la obtenida por los sistemas automatizados actualmente de uso generalizado para la evaluación del hemograma de los pacientes.^(6,7)

No es una técnica analítica el frotis de sangre periférica, por ende, no puede ser calibrada, ni controlado. Pero si pueden ser los analizadores hematológicos que cuentan con materiales diseñados para tal fin. El reporte de un extendido de sangre periférica requiere de un procedimiento estandarizado y un personal con pericia para la elaboración, coloración y observación del frotis para así incrementar la exactitud en el reporte.⁽⁸⁾

La estimación del recuento de plaquetas a partir de frotis sanguíneo debe ser sistemática cada vez que el recuento automático sea erróneo porque incluso el analizador más caro y eficaz no puede reemplazar el juicio humano. Aunque el recuento de plaquetas en frotis es una prueba de laboratorio de rutina diaria, las técnicas de estimación parecen no haber

sido validadas en su totalidad. Esto se debe a que los métodos de validación de las pruebas diagnósticas se finalizaron durante el siglo 20 y los investigadores se sienten tentados a validar primero los nuevos métodos, especialmente los más difundidos. ⁽⁹⁾

En Lima Metropolitana y Callao los Tecnólogos Médicos en Laboratorio Clínico que realizan recuento estimado de plaquetas en frotis sanguíneo ante evidencia de una alarma de plaquetas de sus equipos automatizados, utilizan diferentes métodos indirectos que se basa a parámetros por campo o índices eritrocitarios, entre ellos: El Método factor 20 000, Método de Fonio, Método de Dameshek, entre otros muy poco frecuentes. ⁽⁵⁾

En la actualidad no contamos con guías estandarizadas mediante un consenso nacional para recuento estimado de plaquetas en frotis de sangre periférica, donde se conozca la variabilidad analítica en cuanto a su precisión y exactitud, sin embargo, los profesionales realizan una estimación de plaquetas mediante un método que adquirieron como conocimiento en su formación universitaria, internado, revistas, artículos científicos o en capacitaciones relacionados al área de hematología. ⁽⁵⁾

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.2.1. PROBLEMA GENERAL:

¿Existen diferencias entre los 3 métodos indirectos para recuento estimado de plaquetas en comparación con el gold estándar en frotis de sangre periférica, Lima - Perú, 2022?

1.2.2. PROBLEMAS ESPECIFICOS:

- ¿Cuál es la variabilidad analítica del método Factor 20 000 en frotis de sangre periférica en comparación con el gold estándar para plaquetas?
- ¿Cuál es la variabilidad analítica del método de Fonio en frotis de sangre periférica en comparación con el gold estándar para plaquetas?

- ¿Cuál es la variabilidad analítica del método Dameshek en frotis de sangre periférica en comparación con el gold estándar para plaquetas?
- ¿Cuál de los métodos indirectos para recuento estimado de plaquetas sería recomendable utilizar según su variabilidad analítica en los laboratorios clínicos?

1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.3.1. OBJETIVOS GENERAL:

- Evaluar la diferencia entre los 3 métodos indirectos para recuento estimado de plaquetas en comparación con el gold estándar en frotis de sangre periférica, Lima – Perú 2022.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Evaluar la variabilidad analítica del Método Factor 20 000 en frotis de sangre periférica en comparación con el gold estándar para plaquetas.
- Evaluar la variabilidad analítica del Método de Fonio en frotis de sangre periférica en comparación con el gold estándar para plaquetas.
- Evaluar la variabilidad analítica del Método de Dameshek en frotis de sangre periférica en comparación con el gold estándar para plaquetas.
- Evaluar cuál de los métodos indirectos para recuento estimado de plaquetas sería recomendable utilizar según su variabilidad analítica en los laboratorios clínicos.

1.4 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.4.1. TEÓRICA

Los grandes avances tecnológicos relacionados con parámetros cualitativos y cuantitativos en el conteo de plaquetas, y en particular los derivados de los analizadores hematológicos, que hacen de estos instrumentos más sofisticados y completos para su determinación, el frotis

sanguíneo continúa siendo en la actualidad el “Estándar de oro” siendo un aporte muy valioso en el diagnóstico hematológico.

Todavía no existe evidencia Científica - Tecnológica que haya reemplazado el ojo humano para detectar o identificar cambios sutiles como, por ejemplo, en la serie plaquetaria, el descartar pseudotrombocitopenias, pseudotrombocitosis, por factores secundarios o trombocitopenias verdaderas, lo que corresponde a la calidad de las células (serie blanca, roja y plaquetaria) y sus características morfológicas (cantidad, tamaño, forma y granularidad en caso de las plaquetas). Es por ello que el uso de estos equipos sofisticados complementa, mas no reemplaza el trabajo humano en la revisión detallada de hallazgos de importancia clínica en el frotis sanguíneo, su verificación y recuento estimado de plaquetas.

1.4.2. METODOLÓGICA

La investigación pretende usar formatos validados para evaluar los extendidos y la coloración en frotices sanguíneos. Todos estos criterios para evaluar la calidad del frotis y la coloración se basan según la guía CLSI H20 A2, según Conde y Rodríguez (2018).

Los extendidos sanguíneos serán realizados por extensores automatizados y para la coloración de las láminas, utilizaremos la tinción Wright – Giemsa que serán realizadas de manera manual.

Al final, los frotices y las láminas coloreadas serán evaluadas por un juicio de 3 expertos en hematología utilizando dicho formato. Las lecturas de las láminas aplicando los métodos indirectos en estudio serán recolectadas en una ficha de recolección de datos para su proceso estadístico respectivo.

1.4.3. PRÁCTICA

Teniendo en cuenta la gran importancia clínica que poseen las plaquetas en la hemostasia, y las limitaciones que pueden tener los analizadores

hematológicos para detectar trombocitopenias, trombocitosis u otras alteraciones que afecten la morfología y su alteración en el recuento, debería de verificarse mediante el estudio del frotis sanguíneo utilizando métodos indirectos para recuento estimado de plaquetas.

Este estudio pretende evaluar 3 métodos indirectos para recuento estimado de plaquetas en comparación con un gold estándar a través de la metodología de fluorescencia, para así, conocer la variabilidad analítica y cuál sería el recomendable para ser utilizado en los laboratorios clínicos.

En Lima Metropolitana y Callao – Perú, los Tecnólogos médicos en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica utilizan 3 métodos indirectos para recuento de plaquetas: El Método del Factor 20 000, Método de Fonio y el Método de Dameshek. ⁽⁵⁾

En nuestro país no existen guías estandarizadas para recuento estimado de plaquetas en frotis de sangre periférica, como también no se conoce su variabilidad analítica, el cual puede ser una propuesta a largo plazo para fines de consenso a nivel local y nacional.

1.5 DELIMITACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.5.1. TEMPORAL

La investigación tiene como objetivo recolectar 170 muestras en un periodo estimado de 5 meses, con la finalidad que sea una muestra representativa para los resultados que se vayan a obtener.

1.5.2. ESPACIAL:

Esta investigación se desarrollará en un Laboratorio Clínico que según la NTS N° 072 – MINSA/DGSP- V.01. pertenece al nivel de categorización II- 1, se encuentra en la región de Lima metropolitana, actualmente cuenta con acreditación ISO 15189 y atiende un aproximado de 2500 pacientes por día.

1.5.3. RECURSOS:

El presente estudio cuenta con las herramientas necesarias para poder desarrollar el proyecto de investigación, un laboratorio privado de Lima metropolitana apoyará con la recolección y procesamiento de las muestras sanguíneas en el analizador automatizado bajo la metodología de PLT – F. El desarrollo de los frotices sanguíneos serán realizados por un laminador automatizado y la coloración será de manera manual.

También se cuenta con el apoyo de 3 expertos de hematología que realizarán las lecturas utilizando los 3 métodos indirectos de estudio.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES

2.1.1. INTERNACIONALES

Michal Witkowski et al. “Comparación de varios métodos de diagnóstico para evaluar el recuento de plaquetas en pacientes con trombocitopenia inmunitaria” Polonia, (2021) El objetivo de este estudio fue comparar métodos de recuento plaquetario y encontrar el más confiable. El recuento exacto de plaquetas (PLTC) se evaluó mediante cinco métodos en pacientes adultos con Púrpura trombocitopénica inmune (PTI) no tratada previamente (métodos con EDTA, Método de Citrato, Método de Fonio, Fluorescencia e Inmunofluorescencia). Se inscribieron 66 pacientes en el estudio. La mediana de edad fue de 56 años y el 56% eran hombres. Los datos se presentaron como desviaciones estándar (SD). La mediana de PLTC en EDTA fue 69 G/L, en citrato 69 G/L, en fluorescencia 69 G/L, en Fonio 90 G/L y en inmunofluorescencia 83 G/L. Se observó una diferencia significativa en PLTC al comparar EDTA con inmunofluorescencia ($53\% \pm 123\%$), seguido de Fonio ($51\% \pm 91\%$). La PLTC de inmunofluorescencia difería del método fluorescente en un $40\% \pm 78\%$. No se observó diferencia en PLTC al comparar el método estándar con FFC (Fluorescencia) ($7\% \pm 43\%$) y la morfología con citrato ($7\% \pm 58\%$). El

método más valioso para la obtención de PLTC es el método inmunofluorescente. Estos hallazgos son especialmente importantes para ayudar a tomar decisiones terapéuticas durante un momento difícil para acceder a la atención médica como una pandemia. ⁽¹⁰⁾

Gian C. Ramírez et al. “Validación de un nuevo método de estimar recuentos bajos de plaquetas: Método G&S” Perú, (2020). Los analizadores de hematología son capaces de producir recuentos bajos de plaquetas con gran precisión y exactitud. Sin embargo, estos autoanalizadores producen conteos erróneos debido a la presencia de interferentes y se requieren de metodologías adicionales para corroborar los recuentos de plaquetas, frotis de sangre (recuento indirecto) y recuento directo, utilizando la cámara de Neubauer. Se validó la estimación de confiabilidad producida por el método G&S, donde se analizaron ciento cincuenta conteos de plaquetas en el área de hematología y emergencia del Hospital Nacional Docente Madre Niño - San Bartolomé, mediante cuatro metodologías: por dispersión óptica de plaquetas (PLTO), un conteo indirecto (método de Fonio) en frotis sanguíneo y dos recuentos directos (Directo y G&S). La estadística mostró una correlación positiva entre los métodos, Directo, G&S e indirecto (0.987, 0.998 y 0.981) en comparación con el método automatizado (PLTO). ⁽¹¹⁾

El método Directo, G&S e Indirecto mostró que la mayoría de las diferencias se ubican alrededor del sesgo (4 245.7 plaq./ul, 27.8421 plaq./ul y - 28 984.4 plaq./ ul, respectivamente. El método G&S mostró menor distancia de la media (0) lo que significa que tiene el mayor grado de precisión. En el método indirecto se obtuvo mediciones por debajo de 0, lo que significa que los recuentos de plaquetas tienden a sobreestimar. Aplicaron Bland-Altman demostrando que el método G&S presentó concordancia alta en el método PLTO. Se concluyó que el método G&S es económico, fácil de realizar y ha demostrado confiabilidad estadística con respecto a la metodología automatizada, y es útil para confirmar

recuentos bajos de plaquetas después de una sospecha de error del equipo automatizado o cuando este dispositivo no está disponible para su uso. ⁽¹¹⁾

Vyankatesh T. Anchinmane, Shilpa V. Sankhe. "Utilidad del frotis sanguíneo en la estimación del recuento de plaquetas "India (2019) Existen varios métodos de recuento de plaquetas utilizados en el laboratorio de hematología. Estos métodos son el conteo manual, el conteo automatizado del analizador de hematología, la estimación del conteo de plaquetas en frotis de sangre periférica (PBS), etc. Se realizó un estudio para estimar los recuentos de plaquetas por el método del factor 20 000 y correlacionarlos con los resultados del método del analizador de hematología automatizado. Se usó 100 muestras de sangre con EDTA. Cada muestra se procesó para la estimación del recuento de plaquetas con un analizador de hematología automatizado y un examen de PBS teñido con Leishman. Se evaluaron datos como medidas de tendencia central (media y mediana) y variación (rango y desviaciones estándar) para las cien muestras de sangre. El recuento de plaquetas estimado por el método del factor 20 000 utilizado en este estudio tuvo un rango de 6 a 58 x10³/μl. El recuento de plaquetas del analizador osciló entre 5 - 55 x10³/μl. El método de estimación PBS mostró una media (20,25 x 10³/μl) y una mediana (18 x 10³/μl) en comparación con el método de recuento de plaquetas del analizador (media 19,13 x 10³/μl y una mediana de 16,5 x 10³/μl, respectivamente). Las DE del recuento de plaquetas en sangre entera por el método del analizador y el método PBS fueron 9,4062 x 10³ y 9,2084 x 10³/μl, respectivamente. ⁽¹²⁾

Donde no hubo ninguna diferencia estadísticamente significativa para estos parámetros. Se aplicó correlación de Pearson con el recuento de plaquetas mediante un analizador hematológico como "método de referencia" y el recuento de plaquetas mediante el método PBS como "método de prueba". El resultado de la prueba de correlación de Pearson mostró una pendiente de 1,000 y una intersección con el eje y de -1,120.

El coeficiente de correlación de la regresión lineal para el análisis de la estimación del recuento de plaquetas para el método PBS y el método del analizador hematológico fue de $r = 0,9789$, lo que indica que estos métodos tienen una excelente correlación positiva entre sí para los resultados del recuento de plaquetas. Concluyendo que el método de estimación de plaquetas factor 20 000 puede tomarse como un procedimiento temprano y rápido para la evaluación de plaquetas en casos críticos de trombocitopenia grave. ⁽¹²⁾

Balakrishnan A. et al. “Estimación de recuentos de plaquetas: Analizador automático versus recuentos de frotis de sangre periférica basado en el método tradicional y de proporción de plaquetas: glóbulos rojos” India, (2018). Realizó una comparación del recuento de plaquetas mediante tres métodos: 1. Analizador automático de seis partes. 2. Método tradicional: contar el promedio de plaquetas por diez campos de alta potencia y multiplicar el mismo por 15.000. A partir del frotis contando el número de plaquetas por 1000 glóbulos rojos y calculando el recuento de plaquetas sobre la base de la relación plaquetas: glóbulos rojos. Se analizaron muestras de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para el recuento de plaquetas durante un período de dos meses mediante los métodos mencionados. Se utilizó el software estadístico SPSS y pruebas T independientes para comparar las variables entre los grupos. Se calculó la sensibilidad y especificidad de los métodos. Se analizaron 250 muestras de EDTA de las cuales los recuentos normales de plaquetas fueron (56,4%) trombocitopénicas (35,2%) y trombocitosis (8,4%). No hubo diferencia significativa entre los recuentos de plaquetas realizados por el analizador automático en comparación con el método tradicional (valor de $p = 0,500$) con una sensibilidad de 82.9% y especificidad 98.7%, el método de relación Plaquetas: RBC (0,906) con una especificidad de 96.3% y la sensibilidad de 89.8 %. Se concluyó que los recuentos de plaquetas tradicionales y la relación plaquetas: glóbulos rojos se pueden utilizar como métodos alternativos confiables en comparación con los analizadores automáticos. ⁽¹³⁾

Zainab S. Al- Hosni, Murtadha Al- Khabori “Reproducibilidad de la estimación manual de plaquetas después de recuentos bajos de plaquetas automatizados”, Omán (2016) La estimación manual de plaquetas es uno de los métodos utilizados cuando las estimaciones automatizadas de plaquetas son muy bajas. Sin embargo, la reproducibilidad de la estimación manual de plaquetas no se ha estudiado adecuadamente. Se evaluó la reproducibilidad de la estimación manual de plaquetas después de recuentos de plaquetas bajos automatizados y evaluar el impacto del nivel de experiencia de la persona que cuenta en la reproducibilidad de las estimaciones manuales de plaquetas. En este estudio transversal, frotis de sangre periférica de pacientes con recuentos de plaquetas inferiores a $100 \times 10^9/L$ se recuperaron y se entregaron a cuatro evaluadores para realizar la estimación manual de plaquetas de forma independiente utilizando un método predefinido (promedio de recuentos de plaquetas en 10 campos utilizando objetivo $100\times$ multiplicado por 20). ⁽¹⁴⁾

La estimación media automatizada del recuento de plaquetas ópticas fue de $40 \pm 30 \times 10^9/L$, los datos obtenidos por los evaluadores fueron R1: $51 \pm 44 \times 10^9/L$, R2: $48 \pm 45 \times 10^9/L$, R3: $40 \pm 35 \times 10^9/L$ y R4: $40 \pm 36 \times 10^9/L$, se analizaron los datos utilizando el coeficiente de correlación intraclassa (ICC) como método de evaluación de la reproducibilidad, donde los pares de evaluadores oscilaron entre 0.84 y 0.89, lo que indica una fuerte correlación. Al evaluar la diferencia entre pares de evaluadores, no hubo diferencia significativa en el ICC ($p = 0,420$) Se concluyó que la concordancia entre diferentes evaluadores que utilizaron la estimación manual de plaquetas fue excelente. Es necesaria una confirmación adicional, con un estudio prospectivo que utilice un método estándar de oro de recuento de plaquetas. ⁽¹⁴⁾

Umaraki MK, Shashidhar H.B. “Estimación del recuento de plaquetas a partir de un frotis de sangre periférica basada en la proporción plaquetas: glóbulos rojos. Un estudio prospectivo en un hospital de tercer nivel.” India

(2016) El estudio se realizó con el objetivo de estimar el recuento de plaquetas indirectamente a partir de un frotis de sangre periférica (PBS) sobre la base de la relación Plaquetas: Glóbulos rojos (RBC) y utilizando un recuento de RBC automatizado; y verificar la fiabilidad de este método en comparación con el recuento de plaquetas automatizado. Se realizó un estudio prospectivo en un hospital de tercer nivel con 200 muestras de sangre anticoaguladas con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Las muestras se evaluaron mediante un analizador hematológico automático utilizando el método de recuento de impedancia y mediante el examen de PBS. El número de plaquetas / 1000 RBC en PBS se multiplicó por el recuento automático de RBC en $10^6/\mu\text{L}$ para obtener una estimación del recuento de plaquetas en $10^3/\mu\text{L}$. Se realizó la prueba T de dos muestras donde se obtuvo un recuento de plaquetas automatizadas entre 20 - 688 x $10^3/\mu\text{L}$ y un valor medio de 308 x $10^3/\mu\text{L}$. El recuento estimado de plaquetas tuvo un rango de 15 – 695 x $10^3/\mu\text{L}$ y una media de 309 x $10^3/\mu\text{L}$. El valor de p fue de 0.928 y el valor de T fue de - 0.09, por lo tanto, los dos métodos están altamente correlacionados positivamente. Correlación de Pearson de los dos métodos mostró una alta correlación. Concluyendo que la estimación del recuento de plaquetas sobre la base de la relación plaquetas: glóbulos rojos es una técnica confiable y se puede utilizar para validar recuentos de plaquetas automatizados. ⁽¹⁵⁾

Mohamed Brahimi et al. “La estimación del recuento de plaquetas de un frotis de sangre sobre la base de la proporción de glóbulos rojos: plaquetas”, Argelia (2009). La estimación del recuento de plaquetas a partir de frotis de sangre es una prueba de laboratorio de rutina diaria, que debe ser sistemática cada vez que el recuento automático sea erróneo. Se llevaron a cabo ciento noventa y un recuentos de plaquetas mediante dos métodos de laboratorio: un recuento automático utilizando un contador de células de impedancia y luego un método manual mediante la revisión de frotis de sangre microscópicos. El número de plaquetas por 1000 eritrocitos se multiplicó por el RBC automatizado ($\times 10^6$ células / μL) para dar un recuento manual aproximado ($\times 10^3$ células / μL). Se utilizó la

prueba t de dos pares para comparar los dos métodos. Los análisis de regresión para todo el conjunto de datos recopilados en nuestro estudio con los dos métodos de laboratorio dieron la siguiente ecuación de mínimos cuadrados al comparar el método automático (y) con el manual (x): $y = 0.8548x + 12.013$ ($r = 0.908$). El valor del coeficiente de correlación intraclase (ICC) se mide en una escala de 0 a 1, asumiendo que una buena confiabilidad sería un $ICC > 0.75$, en el estudio, el ICC fue igual a 0.905 que es ampliamente superior a este límite. Se trazó un gráfico de las diferencias entre los valores automático y manual frente a sus medias para evaluar la concordancia entre los dos métodos, y este gráfico mostró que la diferencia media fue igual a 3.209 plaquetas/ μ l, lo que es clínicamente aceptable. Se concluyó que la estimación del recuento de plaquetas a partir de la relación glóbulos rojos: plaquetas es una técnica confiable y debe proponerse como método de referencia. ⁽¹⁶⁾

Raimundo Gomes O. et al. “La recomendación absoluta del método de cámara Neubauer para el recuento de plaquetas en lugar de los métodos indirectos en pacientes con trombocitopenia grave” Brasil (2003) El recuento de plaquetas exacto y preciso es crucial para recomendar la transfusión de plaquetas en pacientes trombocitopénicos, principalmente cuando los recuentos de plaquetas son inferiores a 30.000 / μ l. La mayoría de los laboratorios todavía utilizan los métodos indirectos para confirmar los recuentos de plaquetas automatizados bajos, este trabajo comparó dos métodos indirectos utilizados en la práctica (Método de Fonio y Nosanchuk et al.) Con el método directo recomendado por el Comité Internacional de Normalización en Hematología (Brecher y Cronkite). Los métodos indirectos de recuento de plaquetas se realizaron por triplicado. Cada cuenta se obtuvo como la media de 10 campos de inmersión en aceite (objetivo 100x), en un total de 30 campos. Se evaluaron los datos por el coeficiente de variación (CV%). Los métodos manuales indirectos con coeficientes de variación superiores al umbral aceptable superior (15%) tienen menor precisión y exactitud en comparación con el método de referencia directa. ⁽¹⁷⁾

El análisis de precisión en subgrupos trombocitopénicos según umbrales establecidos para transfusión de plaquetas se obtuvo que el método directo como referencia (ICSH) en recuentos $\leq 10\ 000$ plaquetas /ul presenta un CV de (11.8 %), Nosanchunk et al. (38.6 %) y método de Fonio (36.7 %), en recuentos de 10 000 a 20 000 plaquetas /ul el método directo tuvo un CV de (12%), Nosanchunk et al. (24.7%) y método de Fonio (24%) y en recuentos de $> 20\ 000$ plaquetas/ ul, el método directo tuvo un CV de (8.2 %) , Nosanchunk et al. (19.5 %) y Método de Fonio (18.7%). Los datos obtenidos muestran que los métodos indirectos presentan baja precisión y exactitud, y que el método directo para niveles inferiores a 30 000 plaquetas/ul es el método más exacto y preciso para pacientes que presentan riesgo de sangrado. ⁽¹⁷⁾

2.1.2. NACIONALES

Lucía Rodríguez R. y Ricardo Conde S. “Concordancia en el recuento e identificación morfológica de plaquetas en frotis sanguíneo entre Tecnólogos médicos de hospitales e institutos especializados de lima metropolitana y callao” Lima (2018) El propósito del estudio era hallar el grado de concordancia en recuento e identificación morfológica en frotis de sangre periférica entre Tecnólogos Médicos. El estudio fue descriptivo, prospectivo y de corte transversal. En el periodo de muestreo participaron 106 Tecnólogos Médicos que laboran en el área de Hematología. Se utilizó un cuestionario de 14 preguntas, 3 frotis sanguíneos coloreados (trombocitosis, rangos normales y trombocitopenia) y 4 imágenes de morfología plaquetaria que fueron validados por un juicio de 3 expertos. El CV% que utilizaron los autores para el recuento estimado de plaquetas en lámina periférica fueron entre 69 000 – 111 000 plq./ ul un CV de (23%), recuentos de 236 000 – 320 000 plq./ul un CV de (15%) y recuentos de 636 000 – 860 000 plq./ul un CV de (15%). No se realizó un estudio para determinar la variabilidad analítica. Se obtuvo una concordancia débil para el conteo de plaquetas en frotis de sangre periférica y para la identificación morfológica una concordancia moderada. Es necesario e importante

promover y llevar a cabo un consenso sobre citomorfología hemática, con el propósito de uniformizar los distintos y variados criterios usados en la actualidad. ⁽⁵⁾

Roberts 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”, Lima (2011). La revisión del frotis sanguíneo brinda una estimación cualitativa (bajo, normal y alto) útil del recuento de plaquetas. Nos brinda información de las alteraciones en la morfología: como las macroplaquetas presentes en algunas neoplasias y plaquetas agranulares en el síndrome de plaquetas grises. También permite evaluar la agregación plaquetaria que son producidas por el EDTA, que están asociadas a un falso recuento disminuido de plaquetas; satelitismo plaquetario que pueden conducir a recuentos inexactos; y agregados plaquetarios. Por lo tanto, aunque es menos exacto que un método automatizado, tiene mucho aporte para identificar alteraciones. Entre ellos: Método de Fonio, Método de Dameshek- modificación de fonio y Método factor 20 000. ⁽⁴⁾

Doris G. Pacheco “Estudio de los métodos: automatizado, factor de estimación 20 000 y de Dameshek en comparación al método de cámara para el recuento de plaquetas en sangre venosa” Perú (1999). El propósito fue determinar la veracidad y correlación de los métodos para el recuento automatizado de plaquetas (COBAS ARGOS 5 DIFF) y los métodos indirectos que con mayor frecuencia son utilizados en los laboratorios de Lima y Callao según el Método de recuento en Cámara según Brecher y Cronkite. Se analizaron 245 muestras de sangre venosa en el periodo de enero y febrero de 1999, se procesaron de manera independiente por los cuatro métodos en estudio. ⁽¹⁸⁾

Con los resultados se realizó el análisis de regresión lineal donde se obtuvo que en el método automatizado tuvo un r de 0.82, Factor 20 000 un r de 0.96 y Dameshek 0.96, correlación con el método de referencia

obtuvo el método automatizado un r de 0.9605, Factor 20000 un r de 0.9427 y Dameshek 0.9433 y dispersión del error relativo el Factor 20 000 en recuento muy bajos presenta un DS de 34.93 y un CV de 132.61%, en intervalo bajo un DS 37.19 y un CV 106.13 %, en intervalos normales un DS 19.06 y un CV de 145.83 % y en valores altos un DS de 16.33 y un CV de 135.07% y el Método Dameshek en recuento muy bajos presenta un DS de 25.74y un CV de 117.97% en intervalo bajo un DS 38.88 y un CV 104.74 %, en intervalos normales un DS 17.85 y un CV de 121.43% y en valores altos un DS de 18.39 y un CV de 123.59%. Según el análisis estadístico se concluyó que ningún método es satisfactorio de manera independiente según en el intervalo de recuentos muy bajos, sin embargo, el que mostro mejor correlación es el método Dameshek. En los recuentos mayores a 50 000/mm³, los tres métodos fueron satisfactorios especialmente el método automatizado; sin embargo, los recuentos por este método tuvieron una tendencia a los errores por defecto. ⁽¹⁸⁾

2.2 BASES TEORICAS

2.2.1. Aspectos generales de las plaquetas

2.2.1.1. Megacariopoyesis

Proceso por el cual los megacariocitos, son originados a partir de las células madre troncal totipotencial, cuya función es la formación y producción de plaquetas (trombopoyesis), las cuales son importantes para mantener una adecuada hemostasia en el torrente sanguíneo periférico. Un adulto normal, de 70 kilogramos de peso, produce alrededor de 100.000 millones de plaquetas (10¹¹) por día, siendo en casos necesarios su aumento en casi 20 veces en su producción. ⁽¹⁹⁾

a) Megacarioblasto

Son células grandes irregulares con un solo o multinucleado, redondos u ovalados y un citoplasma azul, no presenta gránulos. Pueden presentar pseudópodos con diversos tintes azulados conteniendo múltiples gránulos.

Los filamentos de núcleo de cromatina se pueden distinguir en los megacarioblastos. Se suelen observar nucléolos. ⁽²⁰⁾

b) Promegacariocito

Se distinguen de los megarioblastos por la presencia de estructuras azurófilas en todo el citoplasma adyacente al núcleo. Su fase 2 de la maduración, el núcleo puede presentarse dividido una o varias veces y aumentando también en tamaño. Pueden presentar apéndices citoplasmáticos azulados de aspecto homogéneo o esponjoso. ⁽²⁰⁾

c) Megacariocito

Los megacariocitos son células grandes con citoplasma parcialmente abundante, forma redonda, bordes lisos y multinucleado. La cromatina nuclear es de forma filiforme y tosca, sus filamentos de cromatina con espacios bien marcados. El citoplasma presenta abundantes gránulos pequeños, que se distribuyen uniformemente de color azul rojizo. ⁽²⁰⁾

d) Metamegacariocito

Se caracterizan por su citoplasma granuloso que se aglomeran en masas separadas entre sí por espacios parcialmente pálidos (membranas de demarcación). Su citoplasma granular puede conglomerarse en la periferia. En su fase más madura los megacariocitos adquieren movimientos lentos ameboides. Extendiendo partes de su citoplasma a través de su membrana basal y entre las células endoteliales de las sinusoides de la médula ósea. ⁽²⁰⁾

2.2.1.2. Trombopoyesis

a) Proplaqueta

Se produce por la extensión de su citoplasma a partir de los Megacariocitos, estas extensiones están compuestas por engrosamientos en tándem del tamaño de plaquetas conectados por finos puentes citoplasmáticos. Este proceso comienza con la erosión de uno de los polos

del citoplasma causando la formación de pseudopodos que comienzan a elongarse formando finos túbulos que se ramifican a lo largo de toda su longitud. ⁽²¹⁾

b) Preplaqueta

Tienen mayor tamaño que las plaquetas maduras, pueden presentar forma circular o de mancuerna. Estas dos formas le permiten mezclar y distribuir el contenido granular. La forma de mancuerna se escinde por la parte central dando lugar a dos plaquetas libres. ⁽²¹⁾

c) Plaquetas

El Colegio Americano de Patólogos (CAP) menciona que “Las plaquetas, también conocidas como trombocitos, son pequeños fragmentos gris azulado proveniente de los megacariocitos maduros. ⁽²²⁾

El Consejo Internacional de Normalización en Hematología (ICSH) refiere que las plaquetas son pequeños fragmentos granulares azul grisáceo que miden de 1.5 a 3 μm de diámetro, proceden del citoplasma de los megacariocitos, que contienen pequeños gránulos rojizo-púrpura. ⁽²³⁾

2.2.1.3. Estructura plaquetaria

Las plaquetas no presentan ADN genómico, pero sí de ARN mensajero (ARNm), producto originado por los megacariocitos. Presentan una forma discoide, sus dimensiones son de aproximadamente 2.0 - 4.0 μm , y con un volumen medio de 7 - 11 fL. Sus características les permite que sean expulsadas hacia los bordes de los vasos sanguíneos, manteniendo la integridad vascular. Su concentración oscila de 150,000-450,000 células/uL. Permanecen en circulación en un promedio de 10 días. ⁽⁵¹⁾

Sus gránulos densos presentan adenosín trifosfato (ATP) y adenosín difosfato (ADP) no metabólicos, serotonina y calcio. Los gránulos alfa contienen proteínas adhesivas como fibrinógeno, fibronectina, factor Von Willebrand (FVW), trombospondina y vitronectina. ⁽⁵¹⁾

Sus gránulos alfa presentan sustancias que estimulan el crecimiento, como el factor plaquetario 4, factor transformador de crecimiento y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP). Los factores de la coagulación, entre ellos factor V, kininógeno de alto peso molecular, factor XI y activador plasminógeno inhibidor-1. ⁽⁵¹⁾

2.2.1.4. Función Plaquetaria

Las plaquetas sin adherirse pueden circular en el endotelio vascular sano. Las plaquetas activadas cumplen un papel importante en la respuesta tanto benignas como patológicas que afecten al torrente sanguíneo y en la formación de trombos. El proceso de transformación de plaquetas inactivas en un tapón plaquetario bien formado ocurre a lo largo de un continuum, que se divide en tres etapas: Adhesión, agregación y secreción. ⁽⁵¹⁾

2.2.2. Alteraciones cuantitativas de las plaquetas

a) Trombocitopenia

German Campuzano M. considera la disminución del número absoluto de plaquetas en el torrente sanguíneo por debajo de 150.000 / μ L. ^(19,52)

b) Pseudotrombocitopenia

Satelitismo Plaquetario

El CAP define "El satelitismo de plaquetas como "rosetones de plaquetas", se debe al aglutinamiento y adherencia de cuatro o más plaquetas a un neutrófilo, o muy raramente a un monocito. Es un fenómeno in vitro producto de la interacción de una inmunoglobulina con el EDTA, existe unión no específica a las plaquetas. Estas interacciones Ag-Ac se ligan a la superficie de neutrófilos o monocitos. Este fenómeno no tiene significado clínico, pero causa trombocitopenia falsa en los contadores celulares automatizados. ⁽²²⁾

c) Trombocitosis

German Campuzano M. define el término utilizado para indicar el aumento, con relación al valor máximo (450.000 por μL) esperado, en el recuento de plaquetas. ⁽¹⁹⁾

2.2.3. Alteraciones cuantitativas de las plaquetas

a) Micromegacariocito

La ICSH define al micromegacariocito como un megacariocito del tamaño de un promielocito aproximadamente o más pequeño como un lóbulo o núcleo bilobulado. Puede presentarse desnudo el núcleo. El citoplasma es parcialmente basófilo. Pueden estar presentes las vacuolas citoplasmáticas y el número variable de gránulos, como también pequeñas protuberancias citoplasmáticas o "ampollas". ⁽²³⁾

Nucifora E. y colaboradores lo define como una pequeña célula, muy basófila, con una corona. Multinúcleos pequeños que están separados de material nuclear, presentando formas hipolobuladas o mononucleadas. Se considera uno de los elementos diagnósticos de Mielodisplasia. ⁽²⁴⁾

b) Microplaquetas

Según el Instituto de Salud Pública de Chile define la microplaqueta con un diámetro menor a $1\mu\text{m}$ de forma redonda u ovalada. Su citoplasma es levemente basófilo-gris con gránulos rojo-purpura. ⁽²⁵⁾

c) Macroplaquetas

La ICSH define como aquellas que miden entre 3 - 7 μm de diámetro, sin embargo, el Instituto de Salud Pública de Chile lo define estructura que oscila entre 4 – 7 μm de forma redonda u ovalada con proyecciones citoplasmáticas (Blebs) finas. Citoplasma levemente basófilo-gris con granulaciones rojo - purpura distribuidas. ⁽²⁵⁾

d) Plaquetas Gigantes, Megaplaquetas

El CAP define a las plaquetas gigantes como mayores de 7 μm , normalmente de 10 a 20 μm de diámetro. En términos morfológicos para identificar una megaplaqueta es utilizando como referencia al tamaño de un hematíe normocítico, si es mayor que el tamaño de la célula roja normocítica se considera megaplaqueta. El borde de la plaqueta gigante puede presentar una forma redonda, festoneada o estrellada. El citoplasma puede presentar granulaciones azurófilas finas, que pueden confundirse en formas gigantes. Las plaquetas gigantes pueden presentarse en condiciones reactivas, neoplásicas y hereditarias. Las causas reactivas pueden incluir situaciones en las que el recambio de plaquetas se encuentra notablemente aumentados como en el caso de la trombocitopenia inmune o reacciones graves leucemoides. Las plaquetas gigantes se observan con frecuencia en los trastornos mieloproliferativos y mielodisplásicos. Las plaquetas gigantes son raras en las condiciones hereditarias, que también cursan con trombocitopenia asociada. Estos trastornos se denominan macrotrombocitopenias congénitas, que incluye la anomalía de May-Hegglin y el síndrome de Bernard – Soulier. ⁽²²⁾

e) Plaquetas Hipogranulares

El CAP lo define como plaquetas que carecen de gránulos enteros, o tienen un número reducido de sus gránulos que se encuentran en las plaquetas normales. Pueden ser normales en tamaño, su forma y la configuración, o incluso ampliadas y deformadas. Su citoplasma es de color azul pálido o gris azulado. Las formas hipogranulares y otras formas displásicas se observan típicamente en trastornos mieloproliferativos y mielodisplásicos. ⁽²²⁾

f) Plaquetas Agranulares

Vizcargüénaga, María Isabel las define como aquellas que aparecen grises en extendidos de sangre periférica o en aspirados de medula ósea cuando se colorean con colorantes Wright – Giemsa. Esto se debe a la

ausencia de gránulos alfa en megacariocitos y en el citoplasma plaquetario. ⁽²⁶⁾

g) Plaquetas Bizarra, Anormales, Amorfo

Segundo Mesa C. define que cursan con morfología anormal, con prolongaciones aumentadas de las filopodias y de su diámetro transversal produciendo deformidad. Se denomina anormal, amorfo. Se pueden observar, pacientes esquizofrénicos, SMD, Síndrome de Bernard Soulier y SMP. ⁽²⁷⁾

2.2.4. Metodologías para recuento de plaquetas

En el estudio y su seguimiento de un paciente con trombocitopenia es importante disponer de un recuento de plaquetas preciso y exacto y esto va a depender, de la metodología que se utilice. Desde el punto de vista del laboratorio clínico se dispone de dos tipos de recuentos de plaquetas: El manual y el electrónico. ⁽²⁸⁾

2.2.4.1. Métodos Manuales

a) Método Directo

Antes de la incorporación de los contadores hematológicos con la finalidad de obtener resultados rápidos en los laboratorios clínicos, se realizaba los conteos de plaquetas en cámara de Neubauer, teniendo como Gold standard la microscopía de contraste de fase utilizando oxalato de amonio 1%. Los métodos manuales para el conteo de plaquetas suelen ser tediosos, se requiere de mucho tiempo del profesional y tienen un coeficiente de variación de 10% a 25% a pesar de cumplir los criterios de calidad. Además, estos métodos no son costo-eficientes porque, consumen mucho recurso humano, tienen limitaciones a pocos parámetros y, sobre todo, son muy imprecisos por lo que en la actualidad no son recomendables. ⁽²⁾

Métodos Directos:

- Método de Brecker y Conkrite
- Método de Rees – Ecker
- Método de Guy y Leakes

b) Método Indirecto

Métodos en base a Parámetros Eritrocitarios:

a) Método de Rabl (1896), modificados por Gottlieb Y Fônio (1912)

Se realiza en aumento de 1000x, en campos donde los eritrocitos se encuentran bien sueltos (monocapa). Se correlaciona de la proporcionalidad entre el N° de eritrocitos y plaquetas por campos y el número de eritrocitos y plaquetas por mm³. Se deben contar como mínimo 10 campos y hacer el promedio, cuantas plaquetas se observan por campo y a la par los datos numéricos de eritrocitos del equipo automatizado. Por ejemplo, si en 15 campos de aproximadamente 180 eritrocitos se observan en promedio, 10.0 plaquetas. En base al recuento total de eritrocitos automatizado (eritrocitos/mm³ – ya previamente conocida, por ejemplo, 3'000,000/mm³), se utiliza la regla de tres simples, obteniendo el número de plaq/mm³. $\text{plaq/mm}^3 = 10.0 \times 3'000,000/180 = 166,666 \text{ plaq} / \text{mm}^3$ ^(15,18,29)

b) Método de Dameshek (modificación del método de Fônio)

Es una modificación del método de Fônio, en el cual el número de glóbulos rojos se calcula a partir del hematocrito del paciente. Este método se debe ubicar con objetivo de 100x, 5 campos de aproximadamente 200 hematíes (pacientes normales) y contar en cada campo el número de plaquetas; la suma de ellos es el número de plaquetas contenido en 1000 hematíes, esta cifra se multiplica por el hematocrito corregido (Hto de paciente + N) del paciente y luego por 100. ⁽¹⁸⁾

c) Métodos en base a aproximación por campos Método del Factor 20 000

Se determina el número de plaquetas por la multiplicación de un factor 20.000, se obtiene de estudios en contadores hematológicos, que transforma el número de plaquetas en mm^3 . En este cálculo, no se requiere de correlacionar eritrocitos con las plaquetas ni saber el recuento de eritrocitos. Requiere de modo determinante, que el análisis del promedio de plaquetas por campo (en aumento de 1000x) al final del recuento de diez campos, se haga obligatoriamente en un lugar de la extensión (cuerpo- cola) donde los eritrocitos estén sueltos (monocapa) pero con algunos tocándose, independientemente del número de eritrocitos en el campo. ⁽²⁹⁾

d) Método de Nosanchuk Chang & Bennett

Para realizar el conteo de plaquetas por este método, se enumeran en el microscopio óptico con aumento de 1000x, plaquetas en 8 campos. La suma obtenida será multiplicada por 2000 (constante) para proporcionar el valor estimado de plaquetas por μl de sangre. ^(7,53)

e) Estimación plaquetaria por el método de Bárbara H. O'Connor

Para realizar el conteo plaquetario por este método, fueron enumeradas con aumento de 1000x, plaquetas en 10 campos y luego se calcula el valor medio por campo. Este valor medio se multiplica por 13 000 (constante de multiplicación) que proporciona el valor estimado del recuento de plaquetas. ⁽⁷⁾

f) Otros métodos de estimación de plaquetas en frotis sanguíneo

Ritu Bajpai et al mencionan de un método que se basa al cálculo en un frotis sanguíneo: El número promedio de plaquetas en un campo de aceite (100x) de multiplicado por 15 000. Contar como mínimo 10 campos con objetivo de inmersión, como promedio representa 15 000 plaquetas / mm^3 .

⁽⁶⁾

Álvaro Moreno y David Menke establecen que un frotis sanguíneo de un paciente sano por lo general presenta 15 a 30 plaquetas en un campo de 400x y de 8 a 20 plaquetas por campo de alta potencia en 1000x de aumento de aceite. Para su verificación se añade el número de plaquetas contabilizadas en 8 a 10 campos por debajo de 1000x (Campo ancho frente a los oculares estándar) y multiplicar esto por 2000 para correlacionar con el recuento total de plaquetas (plaquetas por μL). ⁽³¹⁾

2.2.4.2. Método Electrónico

A pesar de los primeros contadores de células, en donde las trombocitopenias presentaban un alto CV% y tenían que ser verificadas por los métodos directos, teniendo como referencia la microscopía de contraste de fase. La tecnología en los analizadores, con los que se hacen los hemogramas, tienen un CV por debajo de 3% pues utilizan tecnología de impedancia sola o combinada con dispersión óptica, de ahí el motivo por el cual los contadores de 4ta generación son considerados como método para el recuento de plaquetas. ⁽²⁾

Como Gold estándar para recuento de plaquetas según la ICSH y la Sociedad Internacional de Hematología de Laboratorio (ISLH) recomiendan para el conteo de plaquetas la citometría de flujo por fluorescencia, con un recuento de glóbulos rojos mediante un contador de partículas por la metodología de impedancia, mono canal y semiautomatizado. ⁽³²⁾

Representa un método sencillo, objetivo y cuantitativo del análisis de las células y otras partículas en suspensión. Su principio consiste que al momento que pasan las células u otras partículas, alineadas, de una en una, en dirección a un láser. La interacción de las células con el haz de luz produce 2 tipos de datos: lo que se produce por dispersión de luz y lo que se relaciona con la emisión de la luz producto de los fluorocromos que ese encuentran presentes en las células al ser estimuladas por el rayo de luz. Las glicoproteínas de las plaquetas son principalmente para

identificarlas y clasificarlas de una manera correcta según la causa de algunas enfermedades. El fenotipo de plaquetas consiste en la evaluación de sus glicoproteínas de membrana donde se utiliza marcadores específicos como CD41, CD42 y CD61 y es posible caracterizar anomalías en la expresión de glicoproteínas de la membrana, también se han propuesto otros marcadores de adhesión plaquetaria como antiCD42a, antiCD42b, antiCD42c y antiCD42d. ⁽³³⁾

a) Plaquetas Fluorescentes (PLT-F) (Equipos XN de Sysmex)

La serie XN de Sysmex utiliza la impedancia para la mayoría de los conteos de plaquetas. Cuando la veracidad en el conteo de plaquetas llega a sus limitaciones por medio de la impedancia eléctrica, el resultado cursa con una alarma. La serie XN realiza un análisis en un canal nuevo usando un reactivo fluorescente, aumentando su conteo seis veces. Las plaquetas son identificadas y contadas utilizando un colorante fluorescente de oxazina, específico para plaquetas, el cual tiñe la superficie del retículo endoplásmico y la mitocondria plaquetaria. ^(5,34)

En la trombocitopenia, este método tiene una alta exactitud y precisión siendo esencial para las decisiones clínicas apropiadas. Durante el seguimiento en el tratamiento, se utilizan recuentos entre el promedio de 50 y $100 \times 10^3 / \mu\text{L}$ ($50 - 100 \times 10^9 / \text{L}$) como indicativo a la necesidad potencial de transfundir plaquetas. El nuevo método PLT-F demuestra excelentes resultados de reproducibilidad en muestras con recuentos de plaquetas inferiores a $50 \times 10^9 / \text{L}$. ^(5,34)

2.2.5. Interferentes que pueden afectar el recuento de plaquetas en equipos automatizados

a) Macroplaquetas

En condiciones patológicas o no, pueden mostrar las plaquetas un volumen alto, por ello los analizadores consideran las partículas de 30 ó 36 fL de volumen. ⁽⁴⁾

Existen posibilidades donde las plaquetas gigantes no son discriminadas de microcitos, por lo cual no son excluidas del recuento y resulta en un falso recuento disminuido de plaquetas. ⁽⁴⁾

b) Fragmentos de leucocitos

Los pacientes que estén bajo terapia citotóxica pueden presentar en sus muestras, fragmentos de leucocitos, los cuales se tiñen con fluorescencia y son incluidos en el recuento de citometría, debido a las características compartidas del interferente con el tamaño y la intensidad de fluorescencia de las plaquetas. Además, reconocer los fragmentos en un frotis de sangre periférica es dificultoso, pero es más fácil demostrarlo por microscopia electrónica. ⁽⁴⁾

c) Microcitos

Los analizadores hematológicos con principio de impedancia no pueden discriminar plaquetas de hematíes microcíticos y/o macroplaquetas de hematíes de tamaño normal. El método actual de referencia también utiliza la impedancia para obtener un ratio de plaquetas, sin embargo, si la muestra tiene microcitos (en caso de una anemia ferropénica o talasemias) esto debería verificarse con detenimiento, porque probablemente sea inexacto, y por ende haya una sobrestimación en el recuento de plaquetas. ⁽⁴⁾

d) Plaquetas Agranulares

En el síndrome de plaquetas grises, las plaquetas tienen una característica de ser agranulares, gracias a ello, se ve afectado el recuento en la citometría por fluorescencia por la disminución en su intensidad de fluorescencia. ⁽⁴⁾

e) Background

En un recuento de plaquetas debajo de $20 \times 10^9/L$ bajo el principio de impedancia quizá lleguen a ser más inexactos, esto se debe a la disminución de los eventos analizados y la elevada influencia del recuento

de fondo, que por lo general es de $5 \times 10^9/L$ (ejemplo, SYSMEX 1800 XT).
(4)

f) Bacterias

Los microorganismos pueden producir niveles altos en el conteo plaquetario, esto ocurre en situaciones raras (cuando el paciente cursa con sepsis). El histograma es anormal y se produce una agregación hacia la izquierda, donde se ubican estas partículas más pequeñas. No solo sucede en bacterias, los hongos como el caso de *Candida sp*, o hematíes afectados por trofozoitos de *Plasmodium falciparum*. (4)

g) Crioglobulinas

Las crioglobulinas pueden generar un espúreo recuento elevado de plaquetas, dependiendo si estos son lo suficientemente pequeños, y en ciertos casos podrían alterar el recuento de hematíes. (4)

h) Lípidos

Pacientes con hiperquilomicronemia, en muestras después de las comidas, o después de la terapia de nutrición parenteral, los lípidos pueden producir pequeñas gotitas in vitro, que afectan el recuento plaquetario, de igual forma los pacientes leucémicos tratados con L - aspariginasa. Los lípidos poseen un alto índice de refractividad y puede producir señales anormales localizadas cerca al de las plaquetas. (4)

i) Fragmentos de hematíes

Los fragmentos son producidos por la hemólisis de los hematíes, estos fragmentos tienen un tamaño que varía entre las 2um y 4um. Si su origen de los hematíes son fragmentos citoplasmáticos pueden carecer de contenido de ácido nucleico. (4)

Se postula que estos fragmentos o esquistocitos generan falsos recuentos (presentes, por ejemplo, en la anemia microangiopática) produciendo una

sobreestimación del número real de plaquetas en los contadores celulares basados al principio de impedancia. ⁽⁴⁾

2.2.6. Frotis de Sangre Periférica

En el cuidado del paciente, las formulaciones diagnósticas descansan sobre una triada que consiste en la historia clínica, el examen físico y las investigaciones de laboratorio. La literatura revela que hasta el 70% de las decisiones clínicas y los diagnósticos están respaldados por la medicina de laboratorio. El frotis de sangre periférica (FSP) es una herramienta hematológica básica y altamente informativa a disposición del médico en la detección, el diagnóstico y el seguimiento de la progresión de la enfermedad y respuesta terapéutica. Una comprensión experta de la interpretación de la sangre periférica es importante para una práctica clínica exitosa. ⁽³⁵⁾

2.2.6.1. Indicaciones para un frotis de sangre periférica:

El inicio de un Frotis de Sangre Periférica es a menudo una solicitud clínica por parte del médico tratante debido a una sospecha clínica o, con menos frecuencia, iniciado por el laboratorio. El laboratorio puede iniciar un frotis de sangre periférica basándose en hallazgos anormales de un conteo automatizado o información clínica de pacientes cuyo diagnóstico puede estar respaldado por un frotis de sangre periférica. Este último se guía por las políticas de laboratorio individuales o las pautas de regulación locales. ⁽³⁵⁾

Las indicaciones clínicas comunes para el análisis de frotis de sangre periférica incluyen citopenia inexplicable: anemia, leucopenia o trombocitopenia; leucocitosis, linfocitosis o monocitosis inexplicables; ictericia o hemólisis inexplicable; características de anemias hemolíticas congénitas como esplenomegalia, ictericia o dolores óseos; sospecha de enfermedad mieloproliferativa crónica o aguda, p. leucemia mieloide crónica; sospecha de insuficiencia orgánica como enfermedad renal, insuficiencia hepática; características del síndrome de hiperviscosidad como en paraproteinemias, hiperleucocitosis leucémica, policitemia;

sepsis bacteriana grave e infecciones parasitarias; tumores malignos con posible afectación de la médula ósea; casos de sospecha de anemia nutricional; sospecha de enfermedades linfoproliferativas crónicas como la leucemia linfocítica crónica; linfoma con derrames leucémicos; evaluación de la respuesta terapéutica en hemopatías entre otros. ⁽³⁵⁾

2.2.6.2. Requisitos para un frotis sanguíneo aceptable (CLSI H20 A2)

Cualidades deseables de un frotis de sangre:

1. Área de trabajo suficiente.
2. Mínimo 2,5 cm de longitud que termine al menos a 1 cm del final de la lámina.
3. Transición gradual en el grosor de las áreas gruesas a las delgadas, que termina en un borde de pluma.
4. Morfología aceptable dentro del área de trabajo.
5. Más estrecho que el portaobjetos sobre el que se extiende la película, con márgenes laterales suaves y continuos que sean accesibles para el examen por inmersión en aceite.
6. Ningún artefacto introducido por la técnica.
7. Distorsión distributiva mínima.
8. Un extremo lejano que se vuelve gradualmente más delgado, sin vetas granulosas, valles o crestas, todo lo cual indica un mayor número de leucocitos transportados a esta área.

Pueden ocurrir frotices menos óptimas en casos de anemia/policitemia o en casos con proteínas plasmáticas anormales (p. ej., en mieloma, enfermedad por crioaglutininas). ⁽³⁶⁾

2.2.6.3. Preparación del frotis de sangre periférica:

Para garantizar resultados precisos y confiables, se deben controlar las variables preanalíticas que pueden afectar la calidad de la película. Estos incluyen la preparación, el consentimiento del paciente, la técnica de muestreo de sangre, el transporte al laboratorio y la conservación de la muestra. El muestreo de sangre es invasivo, por lo que se debe indicar al paciente sobre el procedimiento. La sangre se obtiene de las venas

periféricas y se almacena en un tubo con anticoagulante. La proporción de sangre a anticoagulante debe estar en la proporción correcta. ⁽³⁵⁾

En casos especiales, la sangre capilar se puede obtener por punción en el dedo. Se debe tener cuidado para garantizar un daño tisular mínimo. El exceso de líquido tisular afecta la distribución de los elementos celulares de la sangre. El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) es el anticoagulante de elección. Las muestras se analizan mejor dentro de las 2 horas posteriores a la extracción de sangre. La demora en la preparación del frotis de sangre puede permitir la degeneración de los elementos celulares de la sangre y puede provocar una pseudotrombocitopenia (recuento de plaquetas falsamente reducido) debido a la formación de agregados de plaquetas. ⁽³⁵⁾

2.2.6.4. Método del portaobjeto o Método de cuña

Para esta técnica se requiere el uso de dos portaobjetos limpios de 75 x 25 mm (3 x 1 pulgadas). Se recomienda el empleo de dos portaobjetos de buena calidad con bordes biselados: uno como soporte del frotis de sangre y el otro como portaobjetos extensor. ⁽³⁷⁾

En un extremo del portaobjetos se agrega una gota de sangre anticoagulada con EDTA K₂ en un promedio de 3 mm de diámetro. Otra opción es agregar una gota de sangre de similar tamaño que fluya en dirección a la punción de un dedo o del talón. Es muy importante el tamaño de la gota. Si la gota es de gran volumen, crea un frotis largo o grueso y, si es de pequeño volumen, el frotis es corto o delgado. Al preparar el frotis sanguíneo, se sostiene firmemente el portaobjetos extensor en dirección a la gota de sangre en un ángulo promedio de 30 a 45 grados sobre el portaobjetos que se realizará el frotis. El extensor se desliza hacia atrás dentro de la gota y se mantiene en esa posición hasta que la sangre se esparce por toda la superficie de contacto entre los portaobjetos. ^(37,38)

2.2.6.5. Método de Wedge – pull (CLSI H20 H2)

1. Prepare tres frotis de sangre de cada muestra en portaobjetos de buena calidad, limpios, secos y sin polvo, de 25 x 75 mm (1 x 3 pulgadas) de 0,8 a 1,2 mm de espesor. Etiquete las láminas A, B y una de "repuesto". Se utilizarán dos frotis de sangre para el procedimiento y el tercero se mantendrá como repuesto. (Si la sangre es leucopénica, prepare una mayor cantidad de extensiones de sangre [p. ej., seis]).
2. Preparar extensiones de sangre dentro de las cuatro horas posteriores a la extracción de sangre.

Nota: No almacene muestras en el refrigerador. Es necesario mezclar adecuadamente (20 inversiones completas) antes de preparar el frotis de sangre.

3. Prepare frotis de sangre utilizando la técnica manual de extracción de cuña. Coloque una gota (aproximadamente 0,05 ml) de sangre bien mezclada cerca de un extremo de un portaobjetos de vidrio. Sostenga un segundo portaobjetos esparcidor más estrecho con bordes pulidos en un ángulo de aproximadamente 45° e inmediatamente aspire la gota de sangre. Deje que la sangre se extienda casi hasta el ancho del portaobjetos. Luego, empuje rápida y suavemente el portaobjetos del esparcidor hacia el extremo opuesto del portaobjetos, tirando de la sangre hacia atrás.
4. Tiñe la lámina dentro de la hora de preparación con una tinción de Romanowsky, que contiene fijadores, o fija dentro de una hora con metanol "sin agua" (es decir, < 3 % de agua) para teñir más tarde. ⁽³⁶⁾

2.2.7. Medición del desempeño analítico

La variabilidad y la incertidumbre son inherentes a todos los fenómenos observados. Por lo tanto, el laboratorio debe tratar de controlar tales fenómenos para establecer límites de referencia de salud y de enfermedad. ⁽³⁹⁾

a) Confiabilidad

Para que un resultado de laboratorio pueda ser considerado como confiable, es de principal importancia que sea preciso y exacto. ⁽³⁹⁾

b) Precisión

Se llama precisión a la repetibilidad o reproducibilidad de resultados que se logra de manera intra o interlaboratorio. La reproducibilidad se cuantifica por lo general en el laboratorio clínico a través de coeficiente de variación porcentual, independientemente de que se trate de un fenómeno analítico o biológico. ⁽³⁹⁾

Coeficiente de variación de un conjunto de resultados obtenidos al medir repetidamente un mensurando con un mismo procedimiento de medida. ⁽⁴⁰⁾

La precisión en las mediciones puede estar influenciada por el que mide (observador), o por aquello con lo que se mide (instrumento de medición); y por lo que es medido, observado, ya sea sujeto o variable/s en estudio. Para evitar errores aleatorios y reducir al máximo los potenciales sesgos de medición, el investigador deberá tener en cuenta la variabilidad de todos y cada uno de estos componentes en el momento de planificar la medición o mediciones de la/s variable/s de un estudio y conocer la confiabilidad del propio observador (intra observador o *intra rater*) o entre observadores (inter observador), si fueran varios de ahí la necesidad de un adecuada formación y entrenamiento de los observadores o del instrumento de medición (intra instrumento), o entre instrumentos (inter instrumento). ⁽⁴¹⁾

- **Imprecisión interdiaria:**

Es la imprecisión que se observa en un laboratorio que inicia con resultados obtenidos en diferentes días.

La imprecisión interdiaria puede obtenerse por condiciones intermedias. Cada laboratorio debe realizar su estimación con la frecuencia de calibración (diaria, semanal, etc.), y los cambios de operador, lote de

calibrador, lote de reactivos, etc., que sean habituales en el trabajo cotidiano. Siguiendo criterios estadísticos se recomienda hacer la estimación con un mínimo de 30 días. ⁽⁴⁰⁾

- **Imprecisión intraserial:**

Es la imprecisión observada de un laboratorio que inicia con resultados obtenidos en una misma serie de medidas.

La imprecisión intraserie se obtiene en condiciones de repetibilidad, es decir, con las mismas muestras, el mismo operador, los mismos componentes del sistema de medida, durante un intervalo corto de tiempo y sin calibraciones entre las mediciones. Según criterios estadísticos es recomendable hacer la estimación con un mínimo de 30 mediciones.

Si los resultados obtenidos de la imprecisión intraserial no son coherentes con resultados previos, ya sea suministrados por el fabricante u obtenidos en la bibliografía, debería interrumpirse el estudio hasta averiguar y corregir la causa de la discrepancia. ⁽⁴⁰⁾

$$CV = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

Donde:

CV: Coeficiente de variación

SD: Desviación Estándar

\bar{X} : Media

Para evaluar la variabilidad total en el laboratorio clínico, el primer paso es el de medir la imprecisión. Por ejemplo, en una serie de muestras de cinco individuos en un tiempo determinado para evaluar sodio en suero. Al realizar las pruebas, tendríamos una serie de resultados semejantes, pero nunca idénticos, por el fenómeno de la variabilidad total. No debemos de olvidar que el proceso de medición por sí mismo puede introducir

variación al fenómeno observado. La confiabilidad es inversamente proporcional a la variabilidad. ⁽³⁹⁾

c) Desviación Estándar

La desviación típica o estándar es la medida de dispersión más utilizada por sus propiedades y porque involucra a todos los datos en su construcción. ⁽³⁹⁾

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_i^N (X_i - \bar{X})^2}{N}}$$

Donde:

σ = Desviación estándar

X = Variable

X_i = Observación número i de la variable X

N = Número de observaciones

\bar{X} = Es la media de la variable X

d) Veracidad

El término veracidad, se define como el grado de concordancia existente entre la media aritmética de un gran número de resultados y el valor verdadero o aceptado como referencia. ⁽⁴²⁾

La veracidad se relaciona con la presencia de errores de tipo sistemático, también se le llama “sesgo”, puede expresarse como un valor absoluto o relativo al valor verdadero. La veracidad de un método de medición es

importante cuando es posible disponer del valor verdadero del mensurando sujeto a medición. ⁽⁴²⁾

El valor verdadero no se conoce en algunos métodos de medición, pero puede ser posible contar con un valor de referencia que sea certificado para el mensurando sujeto a medición; por ejemplo, si se dispone de materiales de referencia, se establece el valor de referencia con base a otro método de medición o mediante la preparación de una muestra conocida. Se podría investigar la veracidad de un método de medición mediante el comparar el valor de referencia certificado, con los resultados que se hayan obtenido por el método de medición. El término sesgo se ha utilizado durante mucho tiempo en cuestiones estadísticas, pero debido a que causó algunas objeciones de carácter filosófico en algunos campos profesionales (tales como la medicina y las leyes), se ha decidido acentuar el aspecto positivo usando veracidad como nuevo término. ⁽⁴²⁾

El término exactitud se utilizó durante cierto tiempo para referirse únicamente a la componente ahora denominada veracidad, pero quedó claro para muchas personas que dicho término debía indicar el desplazamiento total de un resultado con respecto a su valor de referencia, debido tanto a los efectos aleatorios como a los sistemáticos. ⁽⁴²⁾

2.3. FORMULACIÓN DE LA HIPOTESIS

2.3.1. HIPOTESIS GENERAL

H₁: Existe diferencia entre los 3 métodos indirectos para recuento estimado de plaquetas en comparación con el gold estándar en frotis de sangre periférica, Lima – Perú 2022.

H₀: No existe diferencia entre los 3 métodos indirectos para recuento estimado de plaquetas en comparación con el gold estándar en frotis de sangre periférica, Lima – Perú 2022.

2.3.2. HIPOTESIS ESPECIFICOS

H₁: Existe una variabilidad analítica aceptable del Método Factor 20 000 en frotis de sangre periférica en comparación con el gold estándar para plaquetas.

H₀: No existe una variabilidad analítica aceptable del Método Factor 20 000 en frotis de sangre periférica en comparación con el gold estándar para plaquetas.

H₁: Existe una variabilidad analítica aceptable del Método de Fonio en frotis de sangre periférica en comparación con el gold estándar para plaquetas.

H₀: No existe una variabilidad analítica aceptable del Método de Fonio en frotis de sangre periférica en comparación con el gold estándar para plaquetas.

H₁: Existe una variabilidad analítica aceptable del Método de Dameshek en frotis de sangre periférica en comparación con el gold estándar para plaquetas.

H₀: No existe una variabilidad analítica aceptable del Método de Dameshek en frotis de sangre periférica en comparación con el gold estándar para plaquetas.

H₁: El método indirecto para recuento estimado de plaquetas que sería recomendable utilizar según su variabilidad analítica, es el método de Fonio.

H₀: El método indirecto para recuento estimado de plaquetas que no sería recomendable utilizar según su variabilidad analítica, es el método de Fonio.

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. Método de la investigación

El método de investigación es hipotético deductivo, porque se plantearon hipótesis en la evaluación de la variabilidad analítica en los 3 métodos indirectos para recuento estimado de plaquetas. Según Rodríguez y Pérez (2017) refiere que parte de una hipótesis inferida de datos empíricos y aplicando reglas de deducción que se somete a verificación empírica para conocer si existe correspondencia con los hechos, comprobando la veracidad o no de la hipótesis de partida. ^(43,44)

3.2. Enfoque de la investigación

Es de enfoque cuantitativo, porque recurre a la medición numérica de datos recolectados para probar la hipótesis que fueron propuestas, se basa en el análisis estadístico de los mismos para evaluar la variabilidad analítica de los 3 métodos indirectos para recuento estimado de plaquetas en frotis de sangre periférica. Según Hernández S. (2014) refiere que refleja la necesidad de medir y estimar magnitudes de los fenómenos o problemas de investigación, como también se plantea un problema de estudio delimitado y concreto sobre el fenómeno. ⁽⁴³⁾

3.3. Tipo de investigación

El tipo de Investigación es aplicada, porque se pretende conocer la variabilidad analítica de los 3 métodos indirectos en comparación del gold estándar. Según Zoila Vargas (2009) refiere que se caracteriza porque busca la aplicación de los conocimientos ya adquiridos, y a su vez que se adquieren otros, después de sistematizar la práctica basada en la investigación. ⁽⁴⁵⁾

3.4. Diseño de investigación

El diseño de la investigación es experimental – de estudio diagnóstico porque se tiene como objetivo evaluar la variabilidad analítica en 3 métodos indirectos para recuento estimado de plaquetas en frotis de sangre periférica sin influir, ni manipular deliberadamente nuestras

variables de estudio y observar fenómenos tal como se dan en su contexto natural según Hernández S. (2014).⁽⁴⁵⁾ Donde se recolectará datos a través de las lecturas de recuento estimado de plaquetas en los frotices sanguíneos para evaluar la confiabilidad (precisión) y la comparación de los 3 métodos indirectos con un gold estándar para evaluar la validez (sesgo).

3.5. Población, muestra y muestreo

3.5.1. Población

La población estará compuesta por un conjunto de muestras de sangre periférica provenientes de pacientes de ambos sexos, de cualquier edad y raza que se va a realizar un hemograma automatizado donde presenten recuentos de cualquier rango de plaquetas, el lugar donde se realizará la recolección de la muestra, el proceso y los frotices sanguíneos será en un laboratorio clínico de una clínica privada de Lima metropolitana que cuenta con acreditación ISO 15189 y atiende un aproximado de 2500 pacientes por día.

3.5.2. Muestra

Fue calculado con una fórmula probabilística que compara promedios en 4 grupos independientes, en este caso, la comparación de promedios de los 3 métodos indirectos para recuento de plaquetas con el gold estándar para plaquetas (plaquetas fluorescentes). Para el cálculo de poder, se consideró los resultados reportados por Witkowski Michal et al. (2021), utilizando la diferencia mínima de media y la desviación estándar del método de Fonio (media: 90, SD: 51) en evaluación con respecto al gold estándar (media: 69, SD: 40) respectivamente.⁽¹⁰⁾

Es importante que el tamaño de muestra deba garantizar el adecuado control del error tipo 2 (β). Es por ello que el valor mínimo aceptable de la potencia en un estudio de investigación debe ser al menos 80%. Y que se trabaje con un nivel de significancia de 0.05 para controlar el error tipo 1 (α).

A continuación, se muestra el cálculo obtenido por Hsu, Jason.

Se utilizó el Análisis de Poder de Comparación múltiple obteniendo tamaños de muestra de 170, 170, 170 y 170 de los 4 grupos cuyas medias se van a comparar. La muestra total de 680 sujetos logra un poder del 82.19 % para detectar una diferencia de al menos 21,00 utilizando la prueba de comparación múltiple Hsu a un nivel de significancia de 0,05. Se asume que la desviación estándar común dentro de un grupo es 45.50

Los datos obtenidos fueron:

Multiple Comparisons Power Analysis								
Numeric Results for Multiple Comparison Test: Hsu (With Best)								
Power	Average Size (n)	k	Total N	Alpha	Beta	Minimum Detectable Difference	Standard Deviation (S)	Diff / S
0.8219	170.00	4	680	0.0500	0.1781	21.00	45.50	0.4615

Hsu Test Details						
Group	n	Percent n of Total N	Alpha	Power	Minimum Detectable Difference	Standard Deviation
1	170	25.00	0.0500	0.8219	21.00	45.50
2	170	25.00				
3	170	25.00				
4	170	25.00				
Total	680	100.00				

References	
Hsu, Jason. 1996. Multiple Comparisons: Theory and Methods. Chapman & Hall. London.	

Se calculó un tamaño de muestra de 170 con un poder del 82.19% y un nivel de confianza de 0.05.

3.5.3. Muestreo

El muestreo es de tipo probabilístico aleatorio sistemático porque según la población de pacientes que se van a considerar serán a través de un rango clínico muy amplio. Otzen y Manterola (2017) refiere que es cuando el criterio de distribución de los sujetos a estudio en una serie es tal, que los más similares tienden a estar más cercanos. ⁽⁴⁶⁾

Criterios de inclusión

- Pacientes de cualquier edad, género y raza.
- Muestras de sangre venosa que hayan sido tomadas en el laboratorio.
- Pacientes con recuentos bajos, normales y altos de plaquetas.
- Pacientes que presenten cualquier condición de salud.

Criterios de exclusión

- Pacientes que ingieran algún medicamento que produzca agregación plaquetaria, ejm: aspirina, anticoagulante, etc.
- Muestras de sangre venosa que tengan más de 2 horas luego de haber sido tomadas.

3.6. Variable y operacionalización

VARIABLE	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIÓN	INDICADOR	ESCALA DE MEDICIÓN	ESCALA VALORATIVA (NIVELES O RANGOS)
Factor 20000 Método de Fonio Método de Dameshek	Se realizará lecturas de frotices sanguíneos coloreados en microscopio por expertos y estimaran recuento de plaquetas.	Unidimensional	10^3 /ul	Numérica discreta	Bajo Medio Alto
Gold Estándar " PLT- F "	Se procesará bajo la metodología de fluorescencia tiñendo el retículo endoplasmático y la mitocondria plaquetaria.	Unidimensional	10^3 /ul	Numérica discreta	Bajo Medio Alto

3.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.7.1. Técnica

La técnica es de tipo observacional, ya que se recolectará muestras de sangre venosa en tubos de EDTA K₂ que se encuentran en el laboratorio clínico privado para luego ser procesados en el equipo automatizado (Gold estándar).

3.7.2. Descripción de instrumentos

Recolección de muestra: Se recolectará muestras de sangre venosa en tubos EDTA K₂ que hayan cumplido con los criterios preanalíticos. Las muestras serán procesadas dentro de la 1ra hora que fueron recolectadas. Estarán conservadas a temperatura ambiente (24 a 28°C).

Método de ensayo: Las muestras recolectadas serán procesados en el analizador hematológico XN - 3100 Sysmex para el conteo de plaquetas mediante la metodología de plaquetas fluorescentes (PLT-) el cual realiza un análisis automáticamente en un canal nuevo usando un reactivo fluorescente y aumentando su tiempo de conteo hasta seis veces.

En el canal de PLT- F, las plaquetas son reconocidas y contadas utilizando la oxazina como colorante fluorescente, que es muy específico para plaquetas, tiñendo la superficie del retículo endoplásmico y la mitocondria de la plaqueta. Esta identificación celular tiene una correlación excelente con los anticuerpos monoclonales CD41/CD61 y minimiza su interferencia por fragmentos de eritrocitos, microcitos o fragmentos de leucocitos. ⁽⁴⁷⁾

Una vez procesadas las muestras en el analizador hematológico el tubo pasa al laminador automatizado que realiza los frotices sanguíneos cumpliendo los criterios de óptima calidad según CLSI H20 A2. Luego los extendidos de sangre periférica serán coloreados con la tinción Wright – Giemsa de manera manual en base al protocolo aplicado según Conde y Rodríguez (2018). **(Ver anexo 1)**

Se validarán las láminas en base a la calidad del frotis sanguíneo y la coloración mediante un juicio de 3 expertos del área. **(Ver Anexo 2)**

Ficha de recolección de datos: Los 3 expertos realizarán los 3 métodos indirectos para estimar plaquetas (Factor 20 000, Método de Fonio y Método de Dameshek). Se realizará lecturas por triplicado en cada frotis sanguíneo en cada método indirecto en estudio utilizado y los datos serán registrados en un formato de reporte de conteo de plaquetas. **(Ver Anexo 3)**

Luego los datos obtenidos de las lecturas se utilizarán para evaluar la confiabilidad (precisión) y la validez (sesgo) con la comparación mediante el gold estándar (PLT- F).

3.7.3. Validación

En cuanto al Gold Estándar de PLT- F se realizaron los controles externos para poder evaluar la exactitud de la prueba. (falta agregar C. externo o interlaboratorial del gold estándar) Para evaluar la calidad de los frotices y la coloración Wright- Giemsa se utilizarán formatos el cual detalla características importantes según la Guía H20 A2 CLSI que fueron validados por un estudio según Conde y Rodríguez (2018) para que los expertos puedan brindar su juicio de dichas características del formato. ⁽⁵⁾

3.7.4. Confiabilidad

Existen datos generales de los métodos indirectos para el recuento estimado de plaquetas, según Conde y Rodríguez (2018) encontraron un 23% de coeficiente de variación en las trombocitopenias moderadas ($50 - 100 \times 10^3/\text{ul}$). ⁽⁵⁾

En cuanto al Gold Estándar de PLT- F según su información técnica presenta una precisión dentro del $\pm 5\%$ o $\pm 10 \times 10^3/\text{ul}$, una precisión en condiciones de repetibilidad del 2,5% o menos (PLT $100 \times 10^3/\mu\text{L}$ o más) y 5,0% o menos (PLT $20 \times 10^3/\mu\text{L}$ o más), un límite de fondo del $3 \times 10^3/\text{ul}$ o menos. ⁽⁴⁶⁾

3.8. Plan de procesamiento y análisis de datos

3.8.1. Evaluar la confiabilidad (Precisión):

Aplicaremos la fórmula para hallar promedio, SD y CV% con los datos obtenidos.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i \cdot f_i}{n}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_i^N (X_i - \bar{X})^2}{N}}$$

$$CV = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

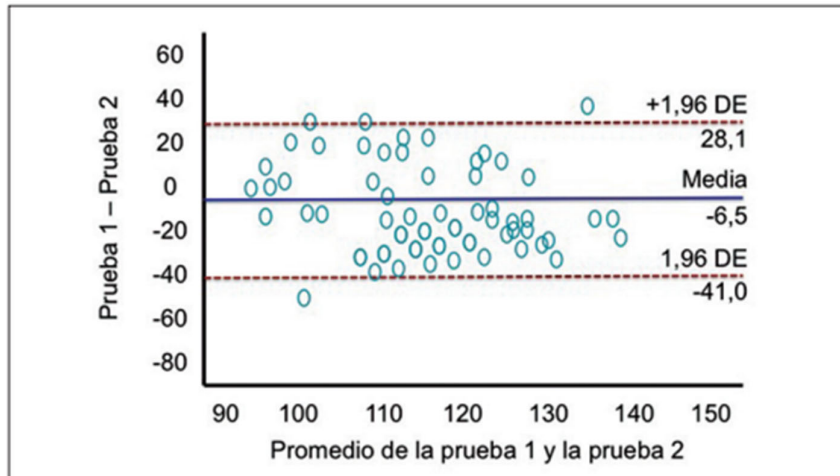
3.8.2. Evaluar la validez (sesgo):

a) Prueba T de Student

La prueba "t" de Student es un tipo de estadística deductiva. Es utilizado para determinar si existe una diferencia significativa entre las medias en dos grupos. Con toda la estadística deductiva, se asume que las variables dependientes poseen una distribución normal. Especificar el nivel de la probabilidad (nivel del alfa, nivel de la significación p) que estamos dispuestos a aceptar antes de los datos (p < 0.05 es un valor común que se utiliza). ⁽⁴⁹⁾

b) Método de Bland Altman

El método permite evaluar el grado de acuerdo entre dos instrumentos que tienen la misma escala de medición. Para ello, es representado de forma gráfica las diferencias que existen entre dos mediciones frente a su media, de similar forma a los gráficos media-diferencia de Tukey. ⁽⁵⁰⁾



3.9. Aspectos éticos

Con el previo conocimiento de los principios éticos, como del Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS) y las leyes nacionales para estudios de investigación, podemos asegurar en mantener en confidencialidad la identidad de las muestras de sangre venosa que participaran en la investigación.

Su ejecución de dicho estudio no involucra ningún riesgo para la salud e integridad de las muestras. Se solicitará el consentimiento al jefe del laboratorio, previa información de los objetivos propuestos del estudio.

Se solicitó la aprobación al comité de ética e investigación de la Universidad Privada Norbert Wiener para la ejecución de dicho estudio, aplicando los principios éticos, bioéticos y sea un beneficio en el campo del diagnóstico clínico.

4. ASPECTOS ADMINISTRATIVOS

4.1. Cronograma de actividades

FASE	AÑO 2022 - 2023																			
	Noviembre				Diciembre				Enero 2023				Febrero 2023				Marzo 2023			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Proceso y validación	x	x	x	x																
Lectura de láminas con los expertos					x	x	x													
Ordenar en tabla los datos								x												
Resultados									x	x										
Plan de procesamiento											x	x								
Análisis de datos													x	x						
Discusión														x						
Conclusiones y recomendaciones															x	x				
Revisión de algún dato																			x	x
Presentación del trabajo																				x

4.2. Presupuesto

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	COSTO UNITARIO (S/.)	COSTO TOTAL (S/.)
MATERIALES DE ESCRITORIO			
Papel A-4	1 millar	12.00	12.00
Folders	1	1.50	1.50
Sobre Manila	4	1.00	4.00
Bolígrafos	2	2.00	4.00
Fotocopias	300	0.10	30.00
Tinta de impresora	3	50.00	150.00
Anillados	3	7.00	21.00
SUBTOTAL			222.50
SERVICIOS TERCEROS			
Internet	Mensual	30.00	120.00
SUBTOTAL			120.00
TRANSPORTE			
Local	200	2.00	400.00
SUBTOTAL			400.00
MATERIAL BÁSICO DE LABORATORIO			
Láminas portaobjeto (25.4 x 76.2 mm)	200	5.00	40.00
Láminas cubreobjeto (24 x 50 mm)	1 paquete	10.00	50.00
Colorante Wright - Giemsa	1L	105.50	105.50
Líquido cubreobjeto para microscopía	50 ml	80.00	80.00
SUBTOTAL			200.5
TOTAL			943.00

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Campuzano M. Germán. Del hemograma manual al hemograma de cuarta generación. La clínica & Laboratorio [Internet]. 2007; 13: p.411-435. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2007/myl011-12b.pdf>
2. Campuzano M. Germán. Interpretación del hemograma automatizado: claves para una mejor utilización de la prueba. Medicina & Laboratorio [Internet]. 2013;19: p.11-68. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2013/myl131-2b.pdf>
3. ICSH and ISLH. Platelet counting by the RBC/platelet Ratio Method: A Reference Method. American Society of Clinical Pathologists. Am J Clin Pathol [Internet]. 2015; 115:460-464. Disponible en: <https://academic.oup.com/ajcp/article/115/3/460/2836636>
4. Congona R. Yuri. 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 para optar el Título profesional de Licenciado en Tecnología médica en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica]. Lima: UNMSM; 2011 Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/2890>.
5. Rodríguez R. Lucía y Conde S. Ricardo. Concordancia en el recuento e identificación morfológica de plaquetas en frotis sanguíneo entre Tecnólogos Médicos de hospitales e Institutos especializados de Lima Metropolitana y Callao, octubre 2017 – marzo 2018. [Tesis para optar el Título profesional de Licenciado en Tecnología médica en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica]. Lima: Universidad Privada Norbert Wiener; 2018. Disponible en: <http://repositorio.uwiener.edu.pe/xmlui/handle/123456789/1749>
6. Bajpai Ritu, Rajak Chanda, Poonia Meghna. Platelet estimation by peripheral smear: Reliable, rapid, cost-effective method to assess degree of thrombocytopenia. International Journal of Medical Science Research and Practice [Internet]. 2015; Vol 2, Issue 2. Disponible en:

http://www.ijmsrp.com/wpcontent/uploads/2015/07/09_Platelet_Count_by_Peripheral_smear_and_automated_cell_counter.pdf

7. Moreno Alvaro, Menke David. Assessment of platelet numbers and morphology in the peripheral blood smear. Clinics in laboratory medicine [Internet]. 2002; N° 1, Vol.: 22. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11933575>
8. Gallardo A. Alfredo y Amadita López. Programa de Evaluación Externa de la Calidad en Morfología Hemática. Diseño y experiencia en laboratorios clínicos venezolanos. Academia Biomédica Digital – Vitae [Internet]. 2007 Julio - septiembre. Disponible en: http://vitae.ucv.ve/pdfs/VITAE_998.pdf
9. Mohamed Brahim et al. The estimation of platelet count from a blood smear on the basis of the red cell: platelet ratio. Turk J Hematol: Turquía [Internet]. 2009;19: p.11-68. Disponible en: https://iaq.journalagent.com/tjh/pdfs/TJH_26_1_21_24.pdf
10. Witkowski Michal, Witkowska Magdalena, Tybura-S. Marzena, Majchzak Agata, Robak Tadeuz, Smolewski Pior. Comparison of various diagnostic methods in assessing platelet count in patients with immune thrombocytopenia. Acta Haematologica Polonica; Polonia [Internet]. 2021; Vol 52, N° 6. Disponible: https://journals.viamedica.pl/acta_haematologica_polonica/article/view/75096
11. Ramírez U. Gian, Neira M. Carlos, Sedano G. Eduardo, Verona C. Joel. Validación de un nuevo método para estimar recuentos bajos de plaquetas: Método G&S. J. Bras. Patol. Med. Lab. [Internet]. 2020; 56: 1-7 Disponible en: <https://www.scielo.br/j/jbpml/a/yqCyCd4fhN3Tc6FnF64DJ4t/abstract/?lang=en>
12. Vyankatesh T. Anchinmane, Shilpa V. Sankhe. Utility of peripheral blood smear in platelet count estimation. International journal of research in medical sciences [Internet]. 2019;7(2): 434-437. Disponible en: <https://www.msjonline.org/index.php/ijrms/article/view/5818>

- 13.** Balakrishnan A, Archana Shetty, Vijaya C. Estimation of platelet counts: auto analyzer versus counts from peripheral blood smear based traditional and platelet: red blood cell ratio method. *Tropical Journal of Pathology & Microbiology. Karnataka* [Internet]. 2018; Vol 4 N°5. Disponible: <https://www.msjonline.org/index.php/ijrms/article/view/8778>
- 14.** Zainab S. Al- Hosni et al. Reproducibility of manual platelet estimation following automated low platelet counts. *Oman medical journal: Omán* [Internet]. 2016; 31(6) 409-413. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5099402/>
- 15.** Umaraki MK, Shashidhar H.B. Estimation of platelet count from peripheral blood smear based on platelet: red blood cell ratio. A prospective study in a tertiary care hospital. *Indian Journal of Pathology and oncology.* [Internet]. 2016; 3(2) 351-353. Disponible: <http://oaji.net/articles/2016/1770-1467607788.pdf>
- 16.** Mohamed Brahimi et al. The estimation of platelet count from a blood smear on the basis of the red cell: Platelet ratio. *Turk J hematol.* [Internet]. 2009; 26(1): 21-4. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27265104/>
- 17.** Gomes O. Raimundo, Mariko T. Maria, Nonoyama Kimiyo, Oliveira B. Orlando. The absolute recommendation of chamber neubauer method for platelets counting instead of indirect methods in severe thrombocytopenic patients. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* [Internet]. 2003; 39(2). Disponible en: <https://www.scienceopen.com/document?vid=62833b38-26f6-4f93-8b38-7e243ac3529a>
- 18.** Guevara P. Doris. Estudio de los métodos: automatizado, factor de estimación 20 000 y de Dameshek en comparación al método de cámara para el recuento de plaquetas en sangre [Tesis para optar el Título profesional de Licenciado en Tecnología médica en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica]. Lima: UNMSM; 1999. Disponible en: http://sisbib03.unmsm.edu.pe/cgibin/koha/opacdetail.pl?biblionumber=73384&query_desc=an%3A70129

19. Campuzano M. Germán. Utilidad del extendido de sangre periférica: las plaquetas. La clínica y el Laboratorio [Internet]. 2008; 14:511-531. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2008/myl0811-12b.pdf>
20. Bell Ana, Sallah Sabah. The Morphology of Human Blood Cells. 6Ed. University of Tennessee Health Science Center. Abbott Laboratories; 2003.
21. Rivadeneyra Leonardo, Carla I. Paola, Schattner Mirta, Gabriel P. Roberto. Así comienza la vida plaquetaria: un viaje desde los megacariocitos medulares a las plaquetas circulantes. Acta bioquímica clínica latinoamericana [Internet]. 2016; 50(2) 233-45. Disponible: <https://www.redalyc.org/pdf/535/53549261008.pdf>
22. The College of American pathologists (CAP). Hematology and Clinical Microscopy Resource Committee [Internet]. 2022; cap. 22-24. Disponible en: <https://documents.cap.org/documents/cap-hematology-and-clinical-microscopy-glossary.pdf>
23. L. Palmer et al. ICSH Recommendations for the standarization of nomenclature and grading of peripheral blood cell morphological features. Int. J. Lab. Hematol. [Internet]. 2015; 37(3) 287-303. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25728865>
24. Nucifora E, Zimmerman J, Fazio P, Prates M. Diagnóstico de Síndromes mielodisplásicos. Sección de Hematología [Internet]. 2010; Vol. 14, N° 103-107. Disponible en: <http://www.sah.org.ar/revista/numeros/vol14.n3.103-107.pdf>
25. Retamales C. Eduardo. Recomendaciones para la interpretación del hemograma: Serie roja, blanca y plaquetaria. Instituto de Salud Pública de Chile [Internet]. 2017; Sept, Versión 2. Disponible en: <http://www.ispch.cl/sites/default/files/Recomendaciones%20para%20la%20Interpretaci%C3%B3n%20del%20Hemograma.pdf>
26. Vizcargüenaga María. Síndrome de pool de depósito. Revisión. Presentación de estudios de laboratorio. Acta Bioquim. Clin. Latinoam.

[Internet]. 2006; vol. 40, núm. 3, pp. 327-334. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/535/53540307.pdf>

27. Mesa C. Segundo. Esquizofrenia y plaquetas. Estudios con microscopia electrónica. Rev. Hosp. Psiquiátrico de la Habana [Internet]. 2003; 7(4). Disponible en: <https://psiquiatria.com/bibliopsiquis/alteracion-ultraestructural-en-las-plaquetas-de-pacientes-esquizofrenicos/>
28. Duarte R. Mónica. Manual del hemograma y el frotis de sangre periférica. Universidad de los Andes, Facultad de Medicina, Ediciones Uniandes [Internet]. 2013; 247 pp. Disponible en: <https://docplayer.es/91491971-Manual-del-hemograma-y-el-frotis-de-sangre-periferica.html>
29. Gómez O. Raimundo. Hemograma: Como hacer e interpretar. 1° Ed. Brasil: Amolca; 2011. 498 p. ISBN: 9789587550344.
30. ICSH and ISLH. Platelet counting by the RBC/platelet Ratio Method: A Reference Method. Am J. Clin. Pathol. [Internet]. 2015; 115:460- 464. Disponible en: <https://academic.oup.com/ajcp/article/115/3/460/2836636>
31. Martínez A. Margarita, López M. Briceida, Parra O. Israel. Pruebas de laboratorio para la evaluación de la función de las plaquetas. Rev. Latinoam. Patol. Clin. Lab. [Internet]. 2015; 62(4): 245 – 252. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2015/pt154g.pdf>
32. Margreet Schoorl, Marianne Schoorl, Jeanette Oomes, Johannes Van Pelt. New Fluorescent method (PLT- F) on Sysmex XN2000 hematology analyzer achieved higher accuracy in low platelet counting. Am. J. Clin. Pathol. [Internet]. 2013; 140: 495- 499. Disponible en: <https://academic.oup.com/ajcp/article/140/4/495/1760656>
33. As Adewoyin, B. Nwogoh. Peripheral blood film - A review. Ann. Ib. Postgrad. Med. [internet]. 2014; vol. 12 no.2 71-79. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4415389/>
34. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Leukocyte (WBC) Differential Count (Proportional) and Evaluation of Instrumental Methods; Approved Standard-Second Edition. CLSI document H20-A2; Pennsylvania USA, 2007.

35. Bernadette F. Rodak, Jacqueline H. Carr. Atlas de Hematología Clínica: 4ª Ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2014. 276 p. ISBN: 9789500601016.
36. Campuzano M. Germán ¿Cómo obtener un extendido de sangre periférica de óptima calidad? Medicina & Laboratorio [Internet]. 2008; vol. 14: 125-152. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2008/myl083-4c.pdf>
37. Terrés S. Arturo. Estimación de la incertidumbre y de la variabilidad total en el laboratorio clínico. Rev. Mex. Patol. Clin. [Internet]. 2006; Vol. 53, N°4, pp.185–196. Disponible en: <http://www.qualitat.cc/sitebuildercontent/sitebuilderfiles/incertidumbre.pdf>
38. Tomás R. Gella, Morer M. Ruíz. Recomendaciones para el estudio de la precisión de los procedimientos de medida en el laboratorio clínico. Soc. Esp. Bioquim. Clin. Patol. Mol. [Internet]. 2003; 22(2)63-65. Disponible en: <https://www.seqc.es/download/doc/161/2927/3624178/56867/cms/recomendaciones-para-el-estudio-de-la-precision-de-los-procedimientos-de-medida-en-el-laboratorio-clinico-2003.pdf/>
39. Manterola Carlos, Grande Luis, Otzen Tamara, García Nayeli, Salazar Paulina, Quiroz Guissela. Confiabilidad, precisión o reproducibilidad de las mediciones. Métodos de valoración, utilidad y aplicaciones en la práctica clínica. Rev. Chil. Infecto. [Internet]. 2018; 35(6):680-688. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182018000600680
40. Nava J. Héctor, López M. María. Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico. Centro Nacional de Metrología [Internet]. 2008;47 p. Disponible en: <http://www.qualitat.cc/sitebuildercontent/sitebuilderfiles/CENAM.EMA.Validacion-verificacion.pdf>
41. Hernández S. Roberto. Metodología de la investigación. México D.F: Mc Graw- Hill Interamericana; 2018. 634 p. ISBN: 9781456223960.

42. Rodríguez J. Andrés, Pérez J. Alipio. Métodos científicos de indagación y de construcción del conocimiento. Rev. Esc. Admin. Neg. [Internet]. 2017; N°82, pp.1-26. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/206/20652069006.pdf>
43. Vargas C. Zoila. La investigación aplicada: una forma de conocer las realidades con evidencia científica. Rev. Educ. [Internet]. 2009; 33(1) 155-165. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/440/44015082010.pdf>
44. Otzen Tamara, Manterola Carlos. Técnicas de muestreo sobre una población a estudio. Int. J. Morphol. [Internet]. 2017; 35 (1): 227-232. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/ijmorphol/v35n1/art37.pdf>
45. Sysmex. Parámetros clínicos avanzados. Analizadores automatizados de hematología serie XN. [Internet]. 2012; 8 p. Disponible en: <https://www.sysmex.com/la/es/Products/Documents/XN-Tecnologia-Espa%C3%B1ol.pdf>
46. Sysmex. Serie XN: (Para el sistema XN-1000) Instrucciones de uso. Analizador hematológico automático. Kobe: Japón; 2011.
47. Sánchez T. Reinaldo. T- Student. Usos y abusos. Rev. Mex. Cardiol. [Internet]. 2015; 26 (1) 59-61. Disponible en: <https://www1.wfh.org/publication/files/pdf-1148.pdf>
48. Sharathkumar Anjali, Shapiro Amy. Trastornos de la función plaquetaria. World Federation of Hemophilia [Internet]. 2008; abril; N° 19. Disponible en: <http://www1.wfh.org/publication/files/pdf-1148.pdf>
49. Campuzano M. Germán. Trombocitopenia: más importante que encontrarla es saber por qué se presenta. Medicina & Laboratorio [Internet]. 2007; 13: 111-152. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2007/myl073-4b.pdf>
50. Samuel R. Comar, Heloisa S. M. Danchura y Paulo H. Silva. Contagem de plaquetas: Avaliação de metodologias manuais e aplicação na rotina laboratorial. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. [Internet]. 2009; vol.31, n.6, pp.431-436. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S151684842009000600011&script=sci_abstract&tlng=pt

ANEXOS

ANEXO 1

TINCIÓN SEGÚN WRIGHT – GIEMSA

Principio:

El color de los núcleos celulares, son frecuentemente rojo púrpura, todo inicia en la interacción molecular de la eosina y el complejo azul B - ADN. Ambos colorantes forman el complejo. El grado de intensidad de la coloración depende del contenido de azul B y de la relación entre azul B y eosina amarilla. El resultado de la tinción puede estar implicado a diferentes factores como el valor del pH de la solución colorante, de la solución tampón (amortiguador), el tiempo de tinción y la fijación.

Resultados:

TIPO DE CÉLULA	RESULTADOS		
	NUCLEO	CITOPLASMA	GRÁNULOS
Linfocitos	Azul violeta	Azul	
Monocitos	(Lobulado) Azul violeta	Azul claro	
Granulocitos neutrófilos	Azul oscuro	Rosa pálido	Tono rosado a azul claro
Granulocitos eosinófilos	Azul	Rosa pálido	Rojo ladrillo
Granulocitos basófilos	Púrpura a azul oscuro		Azul oscuro- negro
Trombocitos (plaquetas)	Azul		
Eritrocitos	Rojizo		

Control de calidad:

El control de calidad de los extendidos sanguíneo serán evaluados por un juicio de expertos donde evaluarán la buena calidad del frotis, distribución de las células y coloración.

Trabajar con los tiempos de coloración establecidos por el laboratorio.

ANEXO 2
FORMATO PARA VALIDAR LA CALIDAD DE UN FROTIS
SANGUÍNEO Y LA COLORACIÓN

Código de lámina:

CRITERIOS DE VALIDACIÓN			EXPERTO 1	EXPERTO 2	EXPERTO 3
CALIDAD DEL EXTENDIDO	LONGITUD*	Bueno			
		Regular			
		Malo			
	TRANSICIÓN GRADUAL*	Bueno			
		Regular			
		Malo			
	BORDES LIBRES*	Bueno			
		Regular			
		Malo			
	MORFOLOGÍA PLAQUETARIA CONSERVADA*	Si			
		No			
	DISTRIBUCIÓN PLAQUETARIA*	Bueno			
		Regular			
		Malo			
	PRECIPITADO Y/O ARTEFACTOS*	Presente			
		Ausente			
	COLORACIÓN	Bueno			
		Regular			
Malo					
AGREGADOS PLAQUETARIOS	Presente				
	Ausente				

*Criterios de validación según H20 A2 CLSI.

 EXPERTO - 1

 EXPERTO - 2

 EXPERTO - 3

ANEXO 3

REPORTE DE CONTEO DE PLAQUETAS EN FROTIS SANGUINEO

MÉTODO FACTOR 20 000

	LECTURA 1	LECTURA 2	LECTURA 3	PROMEDIO
LAMINA 1				
LAMINA 2				
LAMINA 3				
LAMINA 4				
LAMINA 5				
LAMINA 6				
LAMINA 7				
LAMINA 8				
LAMINA 9				
LAMINA 10				
LAMINA 11				
LAMINA 12				
LAMINA 13				
LAMINA 14				
LAMINA 15				
LAMINA 16				
LAMINA 17				
LAMINA 18				
LAMINA 19				
LAMINA 20				
LAMINA 21				
LAMINA 22				
LAMINA 23				
LAMINA 24				
LAMINA 25				
LAMINA 26				
LAMINA 27				
LAMINA 28				
LAMINA 29				
LAMINA 30				
LAMINA 31				
LAMINA 32				
LAMINA 33				
LAMINA 34				
LAMINA 35				
LAMINA 36				
LAMINA 37				
LAMINA 38				

LAMINA 39				
LAMINA 40				
LAMINA 45				
LAMINA 46				
LAMINA 47				
LAMINA 48				
LAMINA 49				
LAMINA 50				
LAMINA 51				
LAMINA 52				
LAMINA 53				
LAMINA 54				
LAMINA 55				
LAMINA 56				
LAMINA 57				
LAMINA 58				
LAMINA 59				
LAMINA 60				
LAMINA 61				
LAMINA 62				
LAMINA 63				
LAMINA 64				
LAMINA 65				
LAMINA 66				
LAMINA 67				
LAMINA 68				
LAMINA 69				
LAMINA 70				
LAMINA 71				
LAMINA 72				
LAMINA 73				
LAMINA 74				
LAMINA 75				
LAMINA 76				
LAMINA 77				
LAMINA 78				
LAMINA 79				
LAMINA 80				
LAMINA 81				
LAMINA 82				
LAMINA 83				
LAMINA 84				
LAMINA 85				
LAMINA 86				
LAMINA 87				
LAMINA 88				
LAMINA 89				
LAMINA 90				
LAMINA 91				
LAMINA 92				
LAMINA 93				
LAMINA 94				
LAMINA 95				
LAMINA 96				
LAMINA 97				
LAMINA 98				
LAMINA 99				
LAMINA 100				
LAMINA 101				
LAMINA 102				
LAMINA 103				
LAMINA 104				
LAMINA 105				
LAMINA 106				
LAMINA 107				
LAMINA 108				
LAMINA 109				
LAMINA 110				
LAMINA 111				
LAMINA 112				
LAMINA 113				
LAMINA 114				
LAMINA 115				
LAMINA 116				
LAMINA 117				
LAMINA 118				
LAMINA 119				
LAMINA 120				
LAMINA 121				
LAMINA 122				
LAMINA 123				
LAMINA 124				
LAMINA 125				
LAMINA 126				
LAMINA 127				
LAMINA 128				

LAMINA 129				
LAMINA 130				
LAMINA 131				
LAMINA 132				
LAMINA 133				
LAMINA 134				
LAMINA 135				
LAMINA 136				
LAMINA 137				
LAMINA 138				
LAMINA 139				
LAMINA 140				
LAMINA 141				
LAMINA 142				
LAMINA 143				
LAMINA 144				
LAMINA 145				
LAMINA 146				
LAMINA 147				
LAMINA 148				
LAMINA 149				
LAMINA 150				
LAMINA 151				
LAMINA 152				
LAMINA 153				
LAMINA 154				
LAMINA 155				
LAMINA 156				
LAMINA 157				
LAMINA 158				
LAMINA 159				
LAMINA 160				
LAMINA 161				
LAMINA 162				
LAMINA 163				
LAMINA 164				
LAMINA 165				
LAMINA 166				
LAMINA 167				
LAMINA 168				
LAMINA 169				
LAMINA 170				

REPORTE DE CONTEO DE PLAQUETAS EN FROTIS SANGUINEO

MÉTODO DE FONIO

	LECTURA 1	LECTURA 1	LECTURA 1	PROMEDIO
LAMINA 1				
LAMINA 2				
LAMINA 3				
LAMINA 4				
LAMINA 5				
LAMINA 6				
LAMINA 7				
LAMINA 8				
LAMINA 9				
LAMINA 10				
LAMINA 11				
LAMINA 12				
LAMINA 13				
LAMINA 14				
LAMINA 15				
LAMINA 16				
LAMINA 17				
LAMINA 18				
LAMINA 19				
LAMINA 20				
LAMINA 21				
LAMINA 22				
LAMINA 23				
LAMINA 24				
LAMINA 25				
LAMINA 26				
LAMINA 27				
LAMINA 28				
LAMINA 29				
LAMINA 30				
LAMINA 31				
LAMINA 32				
LAMINA 33				
LAMINA 34				
LAMINA 35				
LAMINA 36				
LAMINA 37				
LAMINA 38				

LAMINA 39				
LAMINA 40				
LAMINA 41				
LAMINA 42				
LAMINA 43				
LAMINA 44				
LAMINA 45				
LAMINA 46				
LAMINA 47				
LAMINA 48				
LAMINA 49				
LAMINA 50				
LAMINA 51				
LAMINA 52				
LAMINA 53				
LAMINA 54				
LAMINA 55				
LAMINA 56				
LAMINA 57				
LAMINA 58				
LAMINA 59				
LAMINA 60				
LAMINA 61				
LAMINA 62				
LAMINA 63				
LAMINA 64				
LAMINA 65				
LAMINA 66				
LAMINA 67				
LAMINA 68				
LAMINA 69				
LAMINA 70				
LAMINA 71				
LAMINA 72				
LAMINA 73				
LAMINA 74				
LAMINA 75				
LAMINA 76				
LAMINA 77				
LAMINA 78				
LAMINA 79				
LAMINA 80				
LAMINA 81				
LAMINA 82				
LAMINA 83				

LLANWINNA 1829				
LLANWINNA 1830				
LLANWINNA 1831				
LLANWINNA 1832				
LLANWINNA 1833				
LLANWINNA 1834				
LLANWINNA 1835				
LLANWINNA 1836				
LLANWINNA 1837				
LLANWINNA 1838				
LLANWINNA 1839				
LLANWINNA 1840				
LLANWINNA 1841				
LLANWINNA 1842				
LLANWINNA 1843				
LLANWINNA 1844				
LAMINA 106				
LAMINA 106				
LAMINA 102				
LAMINA 108				
LAMINA 100				
LAMINA 106				
LAMINA 106				
LAMINA 102				
LAMINA 108				
LAMINA 100				
LAMINA 156				
LAMINA 156				
LAMINA 152				
LAMINA 158				
LAMINA 150				
LAMINA 166				
LAMINA 166				
LAMINA 162				
LAMINA 168				
LAMINA 160				
LAMINA 100				
LAMINA 106				
LAMINA 102				
LAMINA 108				
LAMINA 100				
LAMINA 126				
LAMINA 126				
LAMINA 127				
LAMINA 128				

REPORTE DE CONTEO DE PLAQUETAS EN FROTIS SANGUINEO

MÉTODO DE DAMESHEK

	LECTURA 1	LECTURA 1	LECTURA 1	PROMEDIO
LAMINA 1				
LAMINA 2				
LAMINA 3				
LAMINA 4				
LAMINA 5				
LAMINA 6				
LAMINA 7				
LAMINA 8				
LAMINA 9				
LAMINA 10				
LAMINA 11				
LAMINA 12				
LAMINA 13				
LAMINA 14				
LAMINA 15				
LAMINA 16				
LAMINA 17				
LAMINA 18				
LAMINA 19				
LAMINA 20				
LAMINA 21				
LAMINA 22				
LAMINA 23				
LAMINA 24				
LAMINA 25				
LAMINA 26				
LAMINA 27				
LAMINA 28				
LAMINA 29				
LAMINA 30				
LAMINA 31				
LAMINA 32				
LAMINA 33				
LAMINA 34				
LAMINA 35				
LAMINA 36				
LAMINA 37				
LAMINA 38				

LAMINA 39				
LAMINA 40				
LAMINA 41				
LAMINA 42				
LAMINA 43				
LAMINA 44				
LAMINA 45				
LAMINA 46				
LAMINA 47				
LAMINA 48				
LAMINA 49				
LAMINA 50				
LAMINA 51				
LAMINA 52				
LAMINA 53				
LAMINA 54				
LAMINA 55				
LAMINA 56				
LAMINA 57				
LAMINA 58				
LAMINA 59				
LAMINA 60				
LAMINA 61				
LAMINA 62				
LAMINA 63				
LAMINA 64				
LAMINA 65				
LAMINA 66				
LAMINA 67				
LAMINA 68				
LAMINA 69				
LAMINA 70				
LAMINA 71				
LAMINA 72				
LAMINA 73				
LAMINA 74				
LAMINA 75				
LAMINA 76				
LAMINA 77				
LAMINA 78				
LAMINA 79				
LAMINA 80				
LAMINA 81				
LAMINA 82				
LAMINA 83				

LAMINA 84				
LAMINA 85				
LAMINA 86				
LAMINA 87				
LAMINA 88				
LAMINA 89				
LAMINA 90				
LAMINA 91				
LAMINA 92				
LAMINA 93				
LAMINA 100				
LAMINA 101				
LAMINA 102				
LAMINA 103				
LAMINA 104				
LAMINA 105				
LAMINA 106				
LAMINA 107				
LAMINA 108				
LAMINA 109				
LAMINA 110				
LAMINA 111				
LAMINA 112				
LAMINA 113				
LAMINA 114				
LAMINA 115				
LAMINA 116				
LAMINA 117				
LAMINA 118				
LAMINA 119				
LAMINA 120				
LAMINA 121				
LAMINA 122				
LAMINA 123				
LAMINA 124				
LAMINA 125				
LAMINA 126				
LAMINA 127				
LAMINA 128				

CONTEO AUTOMATIZADO DE PLAQUETAS

GOLD ESTANDAR: "PLAQUETAS FLUORESCENTES"

	CONTEO AUTOMATIZADO		CONTEO AUTOMATIZADO
LAMINA 1		LAMINA 39	
LAMINA 2		LAMINA 40	
LAMINA 3		LAMINA 41	
LAMINA 4		LAMINA 42	
LAMINA 5		LAMINA 43	
LAMINA 6		LAMINA 44	
LAMINA 7		LAMINA 45	
LAMINA 8		LAMINA 46	
LAMINA 9		LAMINA 47	
LAMINA 10		LAMINA 48	
LAMINA 11		LAMINA 49	
LAMINA 12		LAMINA 50	
LAMINA 13		LAMINA 51	
LAMINA 14		LAMINA 52	
LAMINA 15		LAMINA 53	
LAMINA 16		LAMINA 54	
LAMINA 17		LAMINA 55	
LAMINA 18		LAMINA 56	
LAMINA 19		LAMINA 57	
LAMINA 20		LAMINA 58	
LAMINA 21		LAMINA 59	
LAMINA 22		LAMINA 60	
LAMINA 23		LAMINA 61	
LAMINA 24		LAMINA 62	
LAMINA 25		LAMINA 63	
LAMINA 26		LAMINA 64	
LAMINA 27		LAMINA 65	
LAMINA 28		LAMINA 66	
LAMINA 29		LAMINA 67	
LAMINA 30		LAMINA 68	
LAMINA 31		LAMINA 69	
LAMINA 32		LAMINA 70	
LAMINA 33		LAMINA 71	
LAMINA 34		LAMINA 72	
LAMINA 35		LAMINA 73	
LAMINA 36		LAMINA 74	
LAMINA 37		LAMINA 75	
LAMINA 38		LAMINA 76	

	CONTEO AUTOMATIZADO		CONTEO AUTOMATIZADO
LAMINA 77		LAMINA 115	
LAMINA 78		LAMINA 116	
LAMINA 79		LAMINA 117	
LAMINA 80		LAMINA 118	
LAMINA 81		LAMINA 119	
LAMINA 82		LAMINA 120	
LAMINA 83		LAMINA 121	
LAMINA 84		LAMINA 122	
LAMINA 85		LAMINA 123	
LAMINA 86		LAMINA 124	
LAMINA 87		LAMINA 125	
LAMINA 88		LAMINA 126	
LAMINA 89		LAMINA 127	
LAMINA 90		LAMINA 128	
LAMINA 91		LAMINA 129	
LAMINA 92		LAMINA 130	
LAMINA 93		LAMINA 131	
LAMINA 94		LAMINA 132	
LAMINA 95		LAMINA 133	
LAMINA 96		LAMINA 134	
LAMINA 97		LAMINA 135	
LAMINA 98		LAMINA 136	
LAMINA 99		LAMINA 137	
LAMINA 100		LAMINA 138	
LAMINA 101		LAMINA 139	
LAMINA 102		LAMINA 140	
LAMINA 103		LAMINA 141	
LAMINA 104		LAMINA 142	
LAMINA 105		LAMINA 143	
LAMINA 106		LAMINA 144	
LAMINA 107		LAMINA 145	
LAMINA 108		LAMINA 146	
LAMINA 109		LAMINA 147	
LAMINA 110		LAMINA 148	
LAMINA 111		LAMINA 149	
LAMINA 112		LAMINA 150	
LAMINA 113		LAMINA 151	
LAMINA 114		LAMINA 152	

	CONTEO AUTOMATIZADO		CONTEO AUTOMATIZADO
LAMINA 153		LAMINA 162	
LAMINA 154		LAMINA 163	
LAMINA 155		LAMINA 164	
LAMINA 156		LAMINA 165	
LAMINA 157		LAMINA 166	
LAMINA 158		LAMINA 167	
LAMINA 159		LAMINA 168	
LAMINA 160		LAMINA 169	
LAMINA 161		LAMINA 170	

6.1. Matriz de consistencia

TÍTULO DEL PROYECTO: “EVALUACIÓN DE 3 MÉTODOS INDIRECTOS PARA RECuento ESTIMADO DE PLAQUETAS EN FROTIS DE SANGRE PRIFÉRICA, LIMA – PERÚ, 2022”

AUTOR: LIC. T.M. CONDE SANABRIA RICARDO

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN	VARIABLE	DIMENSIONES	METODOLOGÍA
<p>General: ¿Existen diferencias entre los 3 métodos indirectos para recuento estimado de plaquetas en comparación con el gold estándar en frotis de sangre periférica, Lima-Perú, 2022?</p>	<p>General: Evaluar la diferencia entre los 3 métodos indirectos para recuento estimado de plaquetas en comparación con el gold estándar en frotis de sangre periférica, Lima – Perú 2022.</p>	<p>Método Factor 20 000 Método de Fonio Método de Dameshek Gold Estándar “ PLT-F”</p>	<p>UNIDIMENSIONAL</p>	<p>Enfoque de la investigación: Enfoque cuantitativo</p> <p>Tipo de investigación: Investigación aplicada</p> <p>Nivel de investigación: Descriptiva</p> <p>Método de investigación: Hipotético deductivo</p> <p>Diseño de investigación: No experimental</p> <p>Población: Conjunto de muestras de sangre periférica. Muestra: 170 muestras para recuento de plaquetas.</p> <p>Técnicas de procesamiento de datos: Confiabilidad: (Media, desviación estándar y CV%). Validez: (Método de T Student y Método de Bland Altman)</p>
<p>Específico:</p> <ol style="list-style-type: none"> ¿Cuál es la variabilidad analítica del método Factor 20 000 en frotis de sangre periférica en comparación con el gold estándar para plaquetas? ¿Cuál es la variabilidad analítica del método de Fonio en frotis de sangre periférica en comparación con el gold estándar para plaquetas? ¿Cuál es la variabilidad analítica del método Dameshek en frotis de sangre periférica en comparación con el gold estándar para plaquetas? ¿Cuál de los métodos indirectos para recuento estimado de plaquetas sería recomendable utilizar según su variabilidad analítica en los laboratorios clínicos? 	<p>Específico:</p> <ol style="list-style-type: none"> Evaluar la variabilidad analítica del Método Factor 20 000 en frotis de sangre periférica en comparación con el gold estándar para plaquetas. Evaluar la variabilidad analítica del Método de Fonio en frotis de sangre periférica en comparación con el gold estándar para plaquetas. Evaluar la variabilidad analítica del Método de Dameshek en frotis de sangre periférica en comparación con el gold estándar para plaquetas. Evaluar cuál de los métodos indirectos para recuento estimado de plaquetas sería recomendable utilizar según su variabilidad analítica en los laboratorios clínicos. 			