

## PREPARACIÓN DE UN ESTROMATOLISANTE PARA USO EN EL CONTADOR ELECTRÓNICO DE PARTÍCULAS

Bolívar Alfaro Montero, Edwin Salas, Víctor Vindas\*

Key Word Index: Indicators and reagents, cell count.

### RESUMEN

Se preparó un agente estromatolisante con "Cetrimide" ( $\sigma$ ) y "Sterox" (Harleco) para el cómputo de los leucocitos, en un contador de partículas (Coulter Counter ZBI). A dicho reactivo se le adicionó cianuro de potasio, nitrito de sodio, ferricianuro de potasio y nitroferricianuro de sodio, para medir la hemoglobina en un hemoglobinómetro (Coulter Electronic) mediante la reacción de Drabkin.

El reactivo se comparó con el Zap-Oglobin II (Coulter), utilizando 60 muestras de sangre de pacientes hospitalizados, cuyos recuentos de leucocitos y concentración de hemoglobina eran bajos, normales y altos, dando un coeficiente de correlación de 0,98 ( $y = 103x - 481$ ), para los leucocitos y de 0,99 ( $y = 1,02x - 0,31$ ) para las hemoglobinas.

El coeficiente de variación (C. V.) se obtuvo de una muestra de sangre analizada 33 veces independientemente con ambos estromatolisantes y en un mismo día; dando con el reactivo preparado en nuestro laboratorio (C.S.) de 1,47 por ciento, para los leucocitos y de 0,4 por ciento para la hemoglobina y con el reactivo Zap-Oglobin II fue de 1,78 por ciento para los leucocitos y 0,4 por ciento para la hemoglobina. [Rev. Cost. Cienc. Méd. 1986; 7(2):197-202].

### INTRODUCCIÓN

La automatización en el campo de la hematología ha sustituido algunos métodos manuales aplicados usualmente (4), con lo que se ha logrado obtener resultados valederos tanto por su ejecución, como por su reproductividad y exactitud.

En Costa Rica, los aparatos electrónicos contadores de partículas, usados para el cómputo de leucocitos sanguíneos, se introdujeron a principios de la década del 70. Esto ha traído como consecuencia que se ha producido una gran dependencia de la casa fabricante de estos instru-

mentos, ya que los reactivos que se utilizan son casi siempre producidos por esa misma compañía.

La severa crisis económica que padece Costa Rica, ha hecho casi imposible la importación de los reactivos, por lo cual los aparatos con cierta frecuencia no se pueden utilizar. Esta circunstancia nos ha impulsado a hacer los estudios y las pruebas necesarias para producir un agente estromatolisante para el cómputo de leucocitos. Como agentes estromatolisantes usados en el cómputo de leucocitos en un contador electrónico de partículas, se citan: el Cetavlon (3), el ácido clorhídrico (5), la saponina con cloruro de sodio-solución de Cetrimide-Citrato salina (2) y una solución de ácido pícrico - saponina - metanol - formalina. (1)

Todos estos agentes, permiten la eritrólisis para realizar el recuento de leucocitos. Sin embargo, no convierten la hemoglobina en cianometahemoglobina (7), pigmento estable capaz de ser cuantificado.

Nuestro propósito fue tratar de producir un reactivo con el que se pudieran conseguir ambos fines: realizar el cómputo de leucocitos y a la vez cuantificar la hemoglobina.

Es nuestro criterio que los requisitos que debe presentar el reactivo para los fines deseados son los siguientes:

- Que sea un buen agente estromatolisante.
- Que no destruya los leucocitos durante un tiempo determinado.
- Que permita medir la hemoglobina.
- Que sea estable.
- Que no afecte la conductibilidad del líquido de dilución en donde se procesa la muestra de sangre.
- Que no deteriore los instrumentos.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron 61 muestras de sangre con EDTA (sal disódica del ácido etilendiaminotetracético líquido), en una proporción de 1,5 mg/ml de sangre, de pacientes internados en el Hospital San Juan de Dios, San José, Costa Rica. Estos pa-

\* Laboratorio Clínico Dr. Clodomiro Picado. Hospital San Juan de Dios San José. Costa Rica.

cientes presentaban distintos valores tanto de leucocitos como de hemoglobina.

Las muestras fueron diluidas 1:500 en una solución balanceada de electrolitos, Isoton II<sup>f</sup> (Coulter) para lo cual se utilizó un pipeteador (modelo SA Oxford Laboratories) y una micropipeta (modelo Dialmatic, The Drummond Scientific Co).

Los cómputos de leucocitos se hicieron en un contador electrónico de partículas modelo ZBI Coulter, con un tubo de apertura de 100 u.m. y un umbral de calibración en posición IO. En su calibración se usó el control de células 4C (Coulter). Para obtener la concentración de la hemoglobina se utilizó un hemoglobinómetro modelo HG BR 2 (Coulter), calibrado con controles HB<sub>10</sub>/HB<sub>20</sub> (Coulter). Para efectuar el programa de control diario y el funcionamiento del contador electrónico se siguieron las indicaciones dadas por los representantes de la casa Coulter Company; además se diseñó un programa de control interno utilizando el método de Paz (6).

Como estromatolisante se usaron el Zap-Oglobin II<sup>R</sup> (Coulter) y el estromatolisante C.S. cuya fórmula es la siguiente:

Sterox (Harleco)**	40ml
Cetrimide B.P. (Sigma)***	26,4 g/dl
Nitroferriicianuro de potasio (Merck) ****	0,7 g/dl
Cianuro de potasio (Merck) ****	3,5 g/dl
Nitrito de sodio (Sigma)* **	1,0 g/dl
Ferriicianuro de potasio (Sigma)***	0,3 g/dl
Agua destilada C.S.P	1000,0 ml

Se agregó 6 gotas (aprox. 0,2 ml) de Zap-Oglobin II<sup>R</sup> o de estromatolisante (C.S.) a 20 ml. de sangre diluida 1:500 en Isoton II<sup>R</sup> (Coulter): las lecturas se efectuaron después de 10 minutos de ser agregados los estromatolisantes. Para el lavado de los instrumentos se usó Hemoterge II<sup>R</sup> (Coulter) e Isoterge<sup>R</sup> (Coulter).

## RESULTADOS

Los coeficientes de correlación ( $r^2$ ) obtenidos de 60 muestras de sangre fueron satisfactorios al compararse ambos estromatolisantes (Zap-

+ Coulter Electronic Inc. 590 West. 20 Th Street, Hialeah, Florida 33010. E.U.A.

\*\* Harleco, 480 Democrat Road, Gibbstown, N.J. 08027, EUA

\*\*\* Sigma Chemical Company. PO. Box 14508, Saint Louis MO, 63178, E.U.A.

\*\*\*\* Merck, E. Merck, Dramstadt, R.F. Alemania.

Oglobin II<sup>R</sup> y estromatolisante C.S.): para los cómputos de leucocitos  $r^2$  0,98 (Figura I) y la hemoglobina.  $r^2$  0,99 (Figura II). Se comparó la reproductibilidad de ambos reactivos. Se usó una misma muestra de sangre, y se analizó independientemente 33 veces con los dos estromatolisantes en un mismo día. Con el estromatolisante (C.S.), se obtuvieron los siguientes resultados, C.V.:

—	Para los leucocitos.....	1 .47%
—	Para la hemoglobina .....	0.40%

Con el reactivo comercial:

—	Para los leucocitos .....	1 .78%
—	Para la hemoglobina .....	0.40%

Los resultados obtenidos son analizados en el Cuadro 1.

Los cómputos de leucocitos no variaron en forma significativa entre 10 minutos y 2 horas después de agregado el estromatolisante (C.S.), permitiendo de esta manera hacerlos cómputos de leucocitos en ese lapso durante la rutina diaria (Cuadro 2).

Se procedió a hacer una prueba de precisión con valores altos y bajos de leucocitos y hemoglobina, con el estromatolisante (C.S.). Para ello se probó una muestra de sangre 15 veces para cada parámetro. Los coeficientes de variación en los cómputos de leucocitos fueron de 2,7 por ciento y de 0.6 por ciento para los valores bajos ( $X = 2,8 \times 10^3/\text{mm}^3$ ) y altos ( $X = 16,8 \times 10^3/\text{mm}^3$ ), respectivamente. Los coeficientes de variación en la hemoglobina fueron de 0,7 por ciento y = 0,3 por ciento para los valores bajos ( $X = 4,6 \text{ g/dl}$ ) y altos ( $X=21,6 \text{ g/dl}$ ) respectivamente. (Cuadro 3).

## CONCLUSIÓN

El estromatolisante (C.S.) demostró ser un buen agente usante de glóbulos rojos y eliminador de estromas, además no destruyó los leucocitos hasta después de 2 horas de ser agregado a las muestras de sangre; correlacionó con el ZapOglobin II<sup>R</sup> (Coulter) tanto para el cómputo de leucocitos como para a concentración de hemoglobina; no hubo emisiones anormales en la pantalla del osciloscopio; no hubo deterioro de los aparatos, contador electrónico de partículas y hemoglobinómetro durante la experiencia aproximadamente de 4 meses, posteriormente se ha estado usando en nuestro laboratorio sin ninguna anomalía (aproximadamente 3 años).

Se concluye que ambos estromatolisantes Zap-Oglobin II<sup>R</sup> (Coulter) y C.S. pueden ser usados indistintamente, con la ventaja que el estromatolisante C.S. es de un costo mucho menor.

FIGURA 1

CORRELACIÓN ENTRE EL ZAP O GLOBIN II v.s.  
CETRIMIDE - STEROX (C.S.)  
CON RESPECTO AL RECuento DE LEUCOCITOS

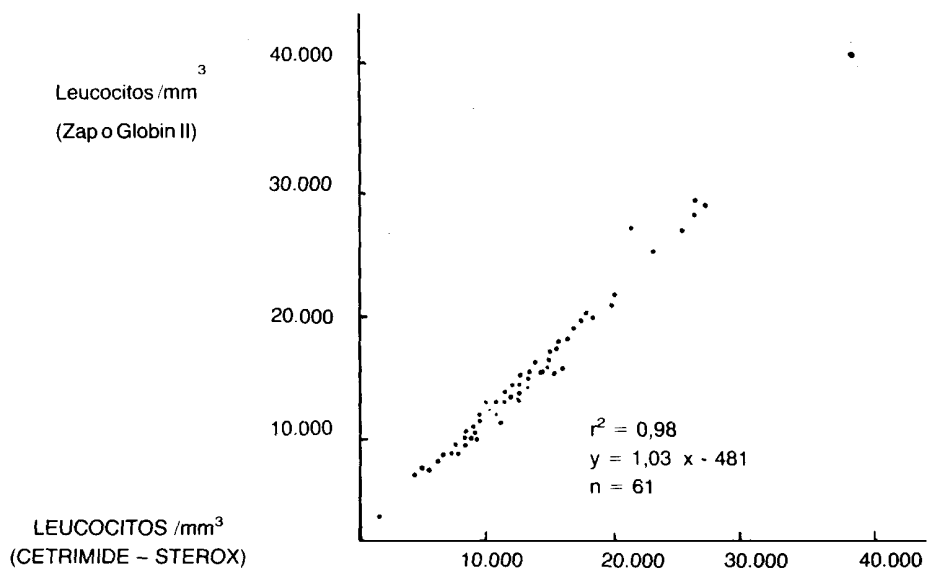
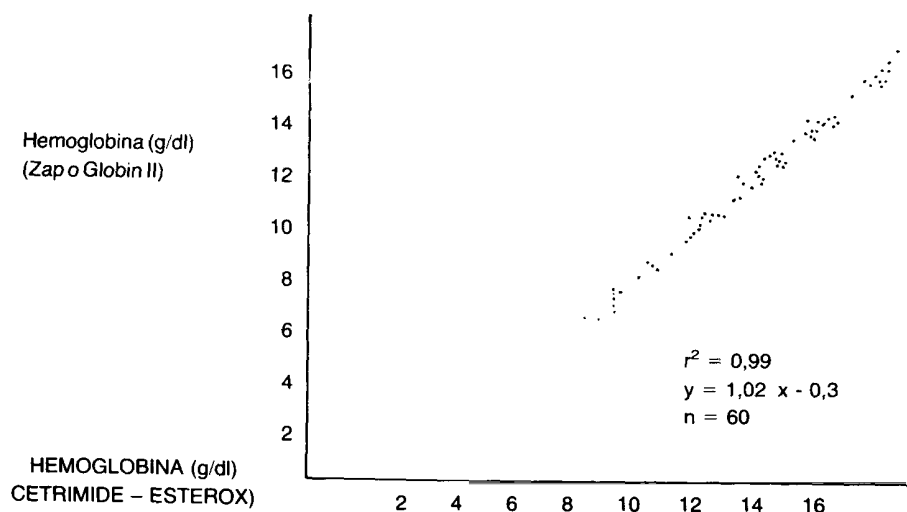


FIGURA 2

CORRELACIÓN ENTRE EL ZAP O GLOBIN II v.s.  
CETRIMIDE - STEROX (C.S.)  
CON RESPECTO A LA CONCENTRACIÓN  
DE HEMOGLOBINA



**CUADRO 1**  
**COMPARACIONES ESTADÍSTICAS ENTRE LOS ESTROMATOLISANTES**  
**ZAP O GLOBIN II Y EL CETRIMIDE-STEROX (C.S.)**

Prueba	Zap o Globin II	Cetrimide - Sterox (C.S.)
<b>RECuento LEUCOCITOS</b>		
Número de muestras	33	33
Promedio	12.200/ mm <sup>3</sup>	12.400/ mm <sup>3</sup>
Desviación estándar	217/ mm <sup>3</sup>	183/ mm <sup>3</sup>
Coefficiente de variación	1,78 %	1,47 %
<b>HEMOGLOBINA</b>		
Número de muestras	33	33
Promedio	14,7 g/dl	15,1 g/dl
Desviación estándar	0,1 g/dl	0,1 g/dl
Coefficiente de variación	0,4%	0,4%

**CUADRO 2**  
**ESTABILIDAD DE LOS LEUCOCITOS DESPUÉS DE AGREGADO EL ESTROMATOLISANTE**  
**CETRIMIDE-STEROX (C.S.) A LOS 10 MINUTOS Y A LAS 2 HORAS**

Número de Muestra	A los 10 minutos (x 1000/ mm <sup>3</sup> )	A las 2 horas (x 1000/ mm <sup>3</sup> )
1	22,7	22,8
2	7,7	7,7
3	9,0	9,1
4	23,8	23,6
5	5,8	5,8
6	11,8	11,8
7	7,5	7,7
8	7,3	7,4
9	11,2	11,5
10	11,8	11,6
11	17,4	18,0
12	11,5	11,5
13	36,8	36,8
14	12,4	12,6
15	15,0	14,9

**CUADRO 3**

**REPRODUCIBILIDAD EN EL CÁLCULO DE LEUCOCITOS  
Y LA CONCENTRACIÓN DE HEMOGLOBINA UTILIZANDO EL  
ESTROMATOLISANTE CETRIMIDE-STEROX (C.S.)**

Recuento bajo		Recuento alto		Concentración baja		Concentración alta	
2,8	2,9	16,8	16,7	4,6	4,6	21,6	21,6
2,8	2,8	16,8	16,6	4,6	4,6	21,7	21,6
2,7	2,7	16,8	16,9	4,6	4,6	21,7	21,7
2,7	2,8	16,8	16,6	4,6	4,6	21,7	21,7
2,7	2,8	16,8	16,7	4,6	4,6	21,7	21,6
2,8	2,8	16,8	16,8	4,6	4,6	21,7	21,6
2,7	2,9	16,8	16,8	4,6	4,6	21,7	21,6
2,9		16,7		4,6		21,6	
<b>Promedio</b>		2,8	16,7	4,6		21,7	
<b>Desviación estándar</b>		0,076	0,096	0,03		0,1	
<b>Coefficiente de variación</b>		2,7 %	0,6 %	0,7%		0,3%	

**AGRADECIMIENTO**

Deseamos agradecer al Dr. Jaime Córdoba Espinoza, Facultad de Farmacia de la Universidad de Costa Rica, por sus atinadas sugerencias en cuanto a la redacción de este trabajo.

**ABSTRACT**

*A stromatolizant agent was prepared with "Cetrimide" and "Sterox" to count white blood cells in an electronic particle counter. Sodium nitrite, Potassium ferricyanide and Sodium nitroferrocyanide were added to that reagent, to measure the hemoglobin in an hemoglobinometer (Coulter Electronic), by the Drabkin reaction.*

*The reagent was compared with Zap-Oglobin II<sup>R</sup> (Coulter), using 60 samples of whole blood. Samples from hospitalized patients, whose leucocyte count and hemoglobin concentration*

*were low, normal and high, yielded a correlation coefficient of 0,98 ( $y = 1.03x - 481$ ) for leucocyte and of 0,99 ( $y = 1,02x - 0,31$ ) for hemoglobin.*

*The variation coefficient, obtained from a blood sample analyzed 33 times for these two stromatolizants, yielded with C.S. reagent variation coefficients of 1,47 percent and of 0,4 percent for white cells and hemoglobin, respectively, and with Zap-Oglobin II<sup>R</sup> Reagent, the variation coefficients were 1,78 percent and 0,4 percent.*

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Allen, J.D. Gudaitis, A.V. Diluting fluid for electronic counting of leucocytes and hemoglobin determinations. *Am. J. Clin. Path.* 1960; 33:553-556.
2. D'Angelo, G. Lacombe, M.A. Practical diluent for electronic white cell counts. *Am. J. Clin. Path.* 1962; 38:658-662.

3. Hatch, A., Balazs, T. The use of cetavlon in a diluent for counting elucocytes in the Coulter electronic counter. *Am. J. Clin Path.* 1961, 36:220-223
4. John, A.K., Fred, B. *The approves laboratory technique*. The University Society Incorporated. New York, 3 ed. 1943; 53-57
5. Otis, R. D., Tennant, R. Hydrochloric acid for stromatolysis of erithrocytes, in coulter leucocytes counting. *Am. J. Clin. Path* 1961; 35:383-386.
6. Paz, J.M., Tutor, J.C., Villar, R., Devesa, J.G. del Rio A. Un programa de control del Coulter Counter S. Estimación de la correlación entre distintos parámetros hemáticos. *Sangre.* 1977; 22:252-262.
7. Sáenz, G.F., *Hematología teórico-práctica morfología homatológica* Universidad de Costa Rica. 6a. edición, 1977; 74-75.