

DESARROLLO DE INTERFACE COMO APOYO EN LA FASE ANALÍTICA DEL LABORATORIO PARA LA DETECCIÓN DE RETICULOCITOS, A TRAVÉS DE MATLAB

Bryan Alejandro Rodríguez Silva, Juana Lizbeth Casillas González

Universidad Politécnica del Bicentenario
16030090@upbicentenario.edu.mx, jgonzalezc@upbicentenario.edu.mx

RESUMEN

En el área de Hematología de un Laboratorio Clínico, el recuento de reticulocitos tradicionalmente se ha considerado como un examen complementario que el médico solicita como una prueba independiente del hemograma para el diagnóstico de diferentes tipos de anemias. En el examen de conteo de reticulocitos se observan los eritrocitos jóvenes que, a diferencia de los eritrocitos maduros, estos conservan en su citoplasma restos de ácido ribonucleico, ribosomas y mitocondrias que pueden ser identificados mediante diferentes colorantes. Estos pueden ser determinados por método manual, por citometría de flujo y, más recientemente, en los autoanalizadores de hematología incorporados al hemograma como un parámetro más, específicamente los hemogramas de cuarta generación. **El recuento manual:** consiste en contar los reticulocitos después de incubar la sangre durante 15 minutos, en presencia de un colorante vital, por ejemplo, el azul brillante de crecilo. Se realiza un extendido de sangre periférica en el portaobjetos y mediante el uso de un microscopio convencional. **El recuento electrónico:** se puede hacer por citometría de flujo como una prueba independiente o en los autoanalizadores de hematología de cuarta generación como parte integral del hemograma.

Palabras clave: Reticulocito, Matlab, Hematología, Citometría, Interface, Microscopio.

ABSTRAC

In the area of Hematology of a Clinical Laboratory, the reticulocyte count has traditionally been considered as a complementary examination that the doctor requests as an independent test of the blood count for the diagnosis of different types of anemia. In the reticulocyte count test, young erythrocytes are observed which, unlike mature erythrocytes, retain ribonucleic acid, ribosomes and mitochondria in their cytoplasm that can be identified by different dyes. These can be determined by manual method, by flow cytometry and, more recently, in hematology autoanalyzers incorporated to the blood count as one more parameter, specifically the fourth-generation blood counts. **Manual counting:** consists of counting the reticulocytes after incubation of the blood for 15 minutes, in the presence of a vital dye, for example, the bright blue of crecilo. A peripheral blood smear is made on the slide and by using a conventional microscope. The electronic count can be done by flow cytometry as an

independent test or in the fourth-generation hematology autoanalyzers as an integral part of the blood count.

Key words: Reticulocito, Matlab, Hematology, Cytometry, Interface, Microscope.

1. INTRODUCCIÓN

En el examen de conteo de reticulocitos se observan los eritrocitos jóvenes que, a diferencia de los eritrocitos maduros, estos conservan en su citoplasma restos de ácido ribonucleico, ribosomas y mitocondrias que pueden ser identificados mediante diferentes colorantes. Estos pueden ser determinados por método manual, por citometría de flujo y, más recientemente, en los autoanalizadores de hematología incorporados al hemograma como un parámetro más, específicamente los hemogramas de cuarta generación.

El surgimiento de la informática y la automatización, deben ser considerados como un reto para incrementar la calidad y la cobertura de los servicios médicos y la disponibilidad de la atención médica para otorgar a los pacientes el máximo beneficio con el menor riesgo y costo logrando equilibrar las expectativas con los resultados.

Es indispensable asignar recursos económicos para capacitar a los profesionales de la salud, así como para la construcción, equipamiento y desarrollo de nuevos y mejores laboratorios. Desafortunadamente una gran desventaja que se presenta en México es que las unidades de salud públicas de segundo nivel no cuentan con un presupuesto económico, por lo cual no pueden acceder a estas tecnologías, es por esta razón que la prueba de conteo de reticulocitos y otras pruebas hematológicas, deben realizarse de forma manual y por consiguiente se genera una gran problemática para la identificación y conteo de células.

Una herramienta tecnológica que puede ayudar a disminuir la problemática que se presenta, es el software de Matlab que, gracias a sus algoritmos integrados, brinda un sistema de procesamiento digital de imágenes con el cual será más accesible y rápido el conteo de reticulocitos en una muestra sanguínea.

2. TEORÍA

En México, aunque existe la NOM- 007-SSA3-2012: la cual habla de la Organización y Funcionamiento de los Laboratorios Clínicos, tenemos que reconocer que, en la práctica, la aplicación de la misma, solo se basa en los requerimientos mínimos de equipamiento para el establecimiento y a la operación de laboratorios. Según el XII Censo de Servicios del INEGI en el año de 1998, se cuenta con 6,487 servicios privados de laboratorios de análisis clínicos auxiliares al diagnóstico médico en el ámbito nacional. La falta de aplicación de la NOM-007-SSA3-2012 genera una competencia desleal, ya que el tamaño del mercado mexicano hace que el número de laboratorios clínicos en el ámbito privado sea incalculable, pudiendo haber más de 10,000 en todo el territorio nacional, donde existen participantes de todo tipo. Los laboratorios clínicos del segundo nivel de atención médica cuentan con cuatro departamentos básicos: Hematología, Química Sanguínea, Inmunología y Microbiología, además el laboratorio clínico ayuda al médico en cualquier momento y en cualquier etapa de

la evaluación clínica: al tratar de detectar una enfermedad, al confirmar un diagnóstico, al evaluar el tratamiento.

El departamento de Hematología, incluye un grupo de exámenes denominados básicos o habituales (hemoglobina, hematocrito, recuento de células de la sangre, examen de la extensión coloreada de sangre periférica, cálculo de constantes corpusculares, velocidad de sedimentación globular) y pruebas especializadas, como los estudios para determinar anemias hemolíticas y condiciones nutricionales, el examen de extensiones de la médula ósea, entre otras.

En el examen de conteo de reticulocitos se observan los eritrocitos jóvenes que, a diferencia de los eritrocitos maduros, estos conservan en su citoplasma restos de ácido ribonucleico, ribosomas y mitocondrias que pueden ser identificados mediante diferentes colorantes (Lewis, 2006).

La cantidad de reticulocitos en sangre indica la tasa de producción de eritrocitos en la médula ósea. Normalmente, los reticulocitos permanecen 2 a 3 días en la médula ósea y de 24 a 48 horas en la sangre periférica hasta cuando se completa su hemoglobinización y se tornan de aspecto maduro. En la tabla 1 se muestran los valores de referencia en el recuento de reticulocitos por edades, esta prueba es de gran importancia debido a que los niveles por debajo del 4% de reticulocitos por decilitro en sangre, pueden ser un factor importante para la detección de una deficiencia de eritrocitos. Estos pueden ser determinados por método manual, por citometría de flujo y, más recientemente, en los autoanalizadores de hematología incorporados al hemograma como un parámetro más, específicamente los hemogramas de cuarta generación (Perkins, 2004).

Tabla 1. Valores de Referencia en el recuento de reticulocitos

Valores de referencia			
	Métodos Manuales		Método Automático
Paciente	Proporción relativa	Valor Absoluto	Valor Absoluto
Neonato	2 – 6 %	65 - 230.10 ³ /μL	-----
Pediátrico	0.5-1.5%	-----	0.5 – 2 %
Adulto	0.5-1.5%	30 - 100.10 ³ /μL	0.5 – 2 %

Nota: debe insistirse en que cada laboratorio clínico debe definir sus respectivos valores de referencia de acuerdo con la población, la instrumentación y la altura sobre el nivel del mar que pueden modificar los parámetros de un lugar a otro y de una institución a otra (Recuperada de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572017000100007)

El recuento manual: consiste en contar los reticulocitos después de incubar la sangre durante 15 minutos, en presencia de un colorante vital, por ejemplo, el azul brillante de creylo. Se realiza un extendido de sangre periférica en el portaobjetos y mediante el uso de un

microscopio convencional; los restos nucleares se observan como una estructura intracitoplasmática, las cuales deben cuantificarse en un mínimo de 10 campos por muestra. A parte de ser un método tedioso, al tener que contar 1.000 células por estudio, es de poca precisión debido a la gran variabilidad en los extendidos, en la coloración y en la interpretación por parte del observador (Fajardo, 1975). **El recuento electrónico:** se puede hacer por citometría de flujo como una prueba independiente o en los autoanalizadores de hematología de cuarta generación como parte integral del hemograma (Fajardo, 1975). Gracias a la incorporación a mediados de la década de los 80 del colorante naranja de tiazol al arsenal de reactivos de citometría de flujo (Figura 1), se pueden medir los reticulocitos en el laboratorio clínico con una excelente precisión y exactitud, con coeficiente de variación alrededor del 4% (ReyesI, 2015).

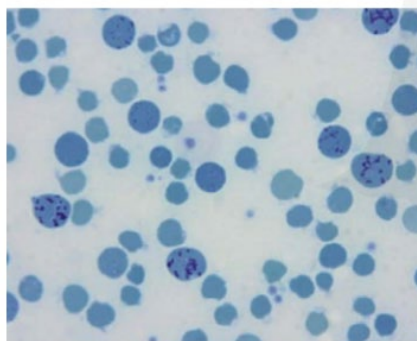


Figura 1. Recuento manual de reticulocitos utilizando la coloración de azul brillante de crecilo 100X (Fajardo, 1975)

Hoy en día, el proceso de automatización se manifiesta en todas las líneas diagnósticas del Laboratorio Clínico. Los equipos del área de hematología (auto analizadores), son considerados de cuarta generación, ya que han incorporado dentro de los parámetros constitutivos del hemograma, el recuento de reticulocitos y los parámetros relacionados con las subpoblaciones de acuerdo con la fluorescencia (elevada, media y baja) que corresponden al grado de maduración de los reticulocitos (Figura2), en donde los primeros son los reticulocitos más jóvenes o inmaduros, en tanto que los últimos representan los reticulocitos más maduros y cercanos al eritrocito adulto (ReyesI, 2015).

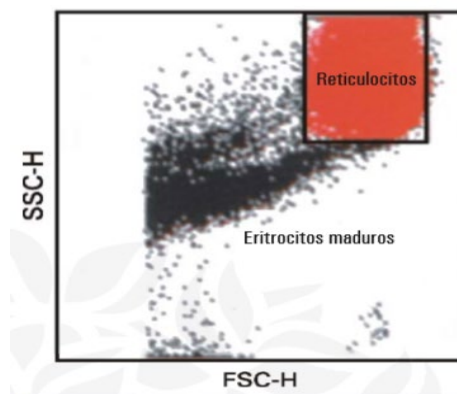


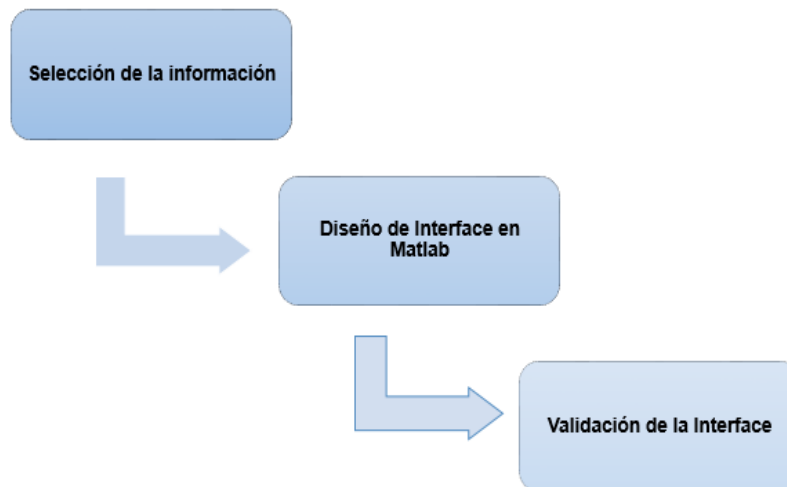
Figura 2. Recuento de reticulocitos por citometría de flujo. La zona roja corresponde a los reticulocitos que tienen un mayor tamaño y complejidad (granulaciones) que los eritrocitos inmaduros (Fajardo, 1975)

Es indispensable asignar recursos económicos para capacitar a los profesionales de la salud, así como para la construcción, equipamiento y desarrollo de nuevos y mejores laboratorios. Desafortunadamente una gran desventaja que se presenta en México, es que las unidades de salud públicas de segundo nivel no cuentan con un presupuesto económico, por lo cual no pueden acceder a estas tecnologías, es por esta razón que la prueba de conteo de reticulocitos y otras pruebas hematológicas, deben realizarse de forma manual y por consiguiente se genera una gran problemática para la identificación y conteo de células (Lavielle, 2007).

Una herramienta tecnológica que puede ayudar a disminuir la problemática que se presenta, es el software de Matlab que, gracias a sus algoritmos integrados, brinda un sistema de procesamiento digital de imágenes con el cual será más accesible y rápido el conteo de reticulocitos en una muestra sanguínea (Fernández, 2016).

Matlab ofrece un lenguaje de programación que permite expresar directamente matrices matemáticas y arreglos vectoriales. Lo mismo ocurre con el análisis de datos, procesamiento de señales e imágenes, diseño de control y otras aplicaciones. Los principales desafíos de ingeniería requieren una amplia coordinación entre los equipos para llevar las ideas a la implementación.

3. PARTE EXPERIMENTAL



El diseño de la interfaz se realizó en Matlab, debido a su amplia gama de algoritmos, que son útiles en el procesamiento digital de imágenes (figura 3 y 4).

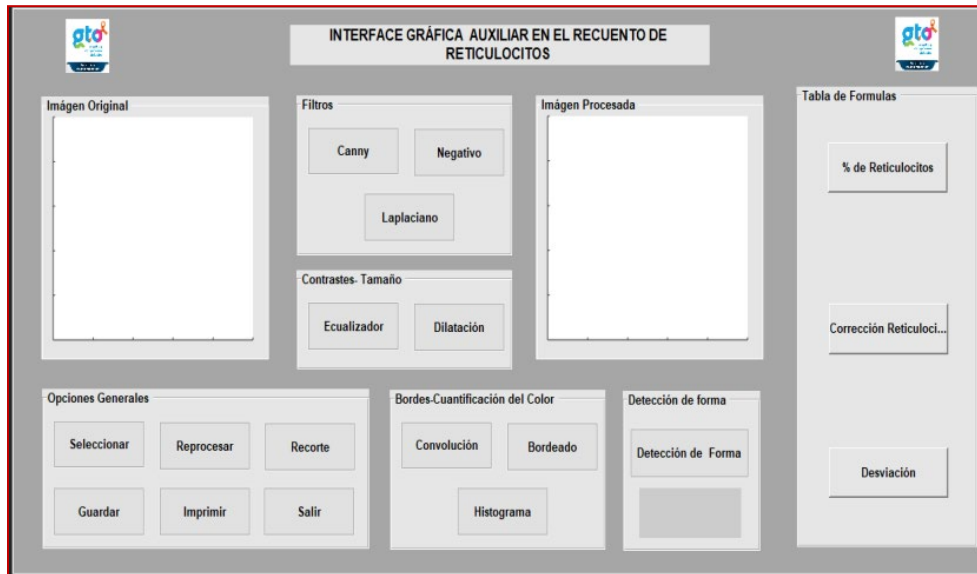


Figura 3. Interfaz gráfica en Matlab. Se observa la interfaz gráfica realizada en Matlab para la detección de reticulocitos. La interfaz está constituida por opciones generales, filtros, detección de forma, detección de bordes, contraste, tamaño y sección de fórmulas, los cuales son algoritmos útiles dentro del procesamiento de imágenes (autoría propia)

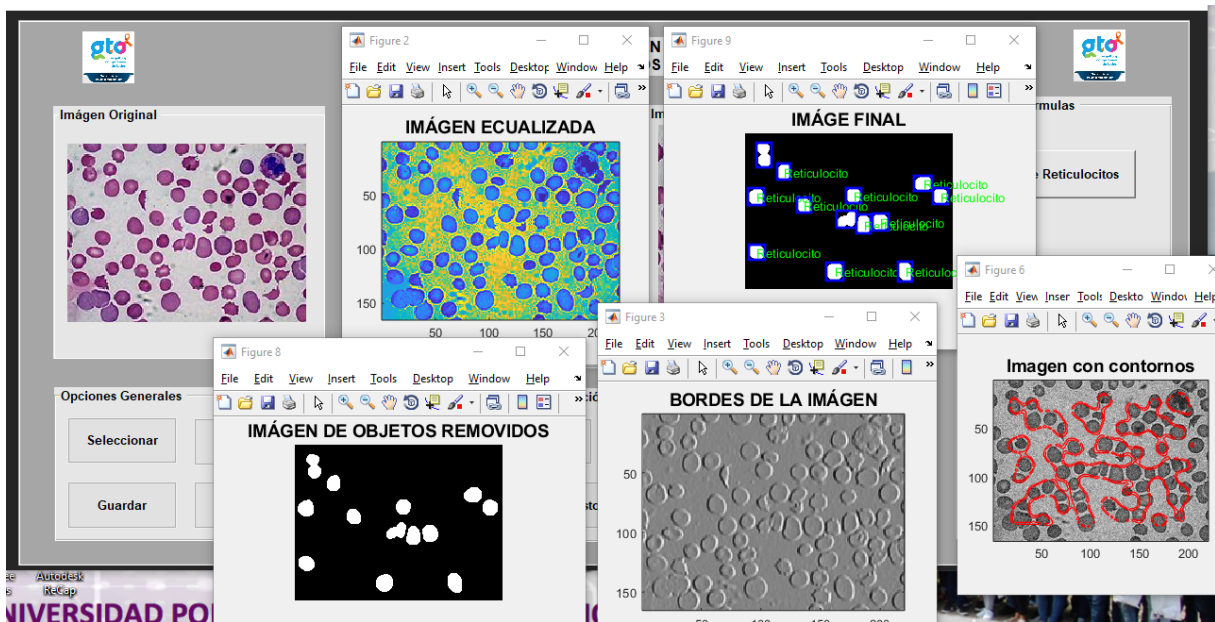


Figura 4. Procesamiento de la imagen. Se observa el funcionamiento de la interfaz, donde a través de algoritmos se pueden identificar características definidas dentro de la imagen (autoría propia)

4. CONCLUSIONES

Gracias al software de Matlab y sus algoritmos de procesamiento digital de imágenes, se logró desarrollar una interfaz capaz de detectar y comparar células sanguíneas (reticulocitos), facilitando así el conteo de reticulocitos en la fase analítica de esta prueba.

Con el desarrollo de la interfaz para la detección y recuento de reticulocitos, se logró realizar la comparación de imágenes procesadas con filtros y comandos de Matlab, con imágenes obtenidas de un citómetro de flujo, mostrando una similitud en la entrega de resultados.

5. REFERENCIAS

- [1] Bain BJ, Lewis SM, Bates I. (2006). *Basic haematological techniques. In Dacie and Lewis practical haematology*, Lewis SM, Bain BJ and Bates I. 5th edition, Churchill Livingstone; Philadelphia, PA, USA. 2006; 26-57.
- [2] Fajardo Lobo-Guerrero LF. *Procedimientos básicos en Hematología. En Técnicas de laboratorio en Hematología Clínica*, Restrepo-Mesa A. Sociedad Colombiana de Hematología, Editorial de la Universidad de Anioquia; Medellín, Colombia. 1975; 3-58.
- [3] Fernández, M. C. (Septiembre de 2016). *Manual básico de Matlab*. Obtenido de Manual básico de Matlab: <http://webs.ucm.es/centros/cont/descargas/documento11541.pdf>
- [4] Lee LG, Chen CH, Chiu LA. *Thiazole orange: a new dye for reticulocyte analysis*. Cytometry B Clin Cytom 1986; 7: 508-517.
- [5] Lavielle, B. (2007). *Programa Nacional de Salud 2007-2012. Por un México sano: construyendo alianzas*. Ciudad de México.
- [6] Ngeleri, A., Ariagno, J., Sardi, M., Carbia, C., Palaoro, L., y Rocher, A. (2018). *Comparación del recuento celular entre un método manual y un contador automatizado*. Obtenido de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572017000100007.
- [7] Perkins SL. (2004). *Examination of the blood and bone marrow. In Wintrobe's clinical hematology*. Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F and Glader B. 11th Edition, Lipincott Williams & Wilkins; Philadelphia, PA, USA. 2004; 16-34.
- [8] ReyesI, L. H. (2015). *El conteo automático de reticulocitos: una herramienta de uso diagnóstico, clínico e investigativo*. Cubana de Hematol, Inmunol y Hemoter, 262.271.