

## Para qué y cuándo han de revisarse las fórmulas leucocitarias manuales: citología frente a citometría

MODERADOR: J.M. JOU. *Barcelona*

Los primeros analizadores hematológicos, que realizaban el hemograma sin plaquetas, fueron introducidos en nuestro país a principios de 1970. El recuento diferencial leucocitario (RDL) automatizado fue añadido a finales de los años setenta. Todo ello supuso un cambio radical en el trabajo diario de los laboratorios de hematología que hasta entonces realizaban los contajes celulares en cámara y el RDL mediante extensión manual que era impreciso, inexacto y tedioso. El objetivo principal de los actuales laboratorios es procesar más muestras con el menor costo posible. El RDL manual consume tiempo y su costo es muy alto en personal. Un estudio realizado en nuestro laboratorio mostró los siguientes resultados: buscar el tubo, hacer extensión y teñir: 2 minutos y 30 segundos; realizar el RDL manual: 5 minutos. En total: 7 minutos y 30 segundos. Ello representa un coste de 2,2 euros, si lo hace un técnico, y de 3,2 euros, si lo hace un facultativo.

La finalidad del presente foro de debate es conocer las indicaciones y limitaciones de las revisiones manuales del RDL. Las ponencias presentadas por T. Molero y J. Villarrubia, reconocidos expertos a nivel internacional en temas de automatización y citología, son muy documentadas, claras, detalladas, coordinadas y concluyentes. El tema parece banal, pero no lo es. Los analizadores han evolucionado y su tecnología, en muchos casos, supera las limitaciones, de todos conocida, del RDL manual.

Una de las pruebas más evidentes de las limitaciones del RDL manual ya la mostró C.L. Rümke<sup>1</sup>, reconocido estadístico de pruebas de laboratorio, en 1985 (Tabla 1). En ella se muestran los límites de confianza al 95% de los RDL manuales dependiendo del número de células contadas (de 100 a 1.000) en cada extensión y el resultado obtenido (de 0 a 50%). En ella vemos que un resultado del 7% , contando 100 células, por estadística puede oscilar entre 2 y 14. En cambio, si contamos 1.000 células su valor estará entre 5 y 9. Como vemos en la Tabla 1, las variaciones son muy considerables y podemos entender lo presentado por los ponentes cuando dicen que el nivel de concordancia entre observadores experimentados para el recuento de cayados es de menos del 50%, incluso intraobservador.

La nueva publicación sobre el método de referencia del RDL manual (H20-A2), dirigida por J. Koepke, del 2007<sup>2</sup>, que es establecida por el Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI antes NCLLS) ya explica todos los cuidados y limitaciones que deben tenerse con la técnica por indudables limitaciones. El Internacional Council for Standardization in Haematology (ICSH), que ha sido renovado y activado este año, ha establecido un grupo de trabajo denominado Extended Differential Blood Count, que dirige Bruce H. Davis<sup>3</sup>. Dicho grupo está estableciendo un método de referencia para el RDL mediante marcadores monoclonales y citometría de flujo ante la evidente limitación de usar el RDL manual como referencia.

Como citan ambos ponentes, en la actualidad, la información que proporcionan las gráficas de los analizadores debe ser conocida por el personal que trabaja con ellos. Ello evitaría muchas revisiones manuales y se entenderían mucho mejor las limitaciones del RDL manual que es muy impreciso respecto a los sistemas automáticos. Debemos conocer las limitaciones de los analizadores, su interpretación y, a la vez, conocer las que tiene el RDL manual. Es indudable que el RDL manual debe ser utilizado aún pero en casos muy concretos y para fines específicos como son anomalías específicas de la serie roja, en casos de mielodisplasia, en recuentos (aunque imprecisos) de blastos y granulocitos inmaduros, detectar algunos parásitos, en casos específicos de dismorfia plaquetaria y en aquellos en que veamos que los sistemas presentan anomalías de detección. La incorporación de marcadores monoclonales en los analizadores es un hecho evidente. Así, para detección de las inflamaciones e infecciones se está incorporando el CD64, para el estudio de los linfocitos se utilizan AcMo para T, T4, T8, B y NK, para las plaquetas el CD 61 y otros en vías de desarrollo.

La conclusión quizá sea la apuntada por uno de los ponentes "el tradicional recuento y observación del diferencial leucocitario al microscopio puede ser el pasado y posiblemente pase a la historia dentro

de poco tiempo” aunque, en la actualidad, existen algunas indicaciones específicas, pero que creo que en poco tiempo serán superadas por la nueva tecnología más exacta y precisa.

Espero que el debate sea clarificador, extenso y constructivo para todos los asistentes al Congreso.

**Tabla 1. Recuentos leucocitarios. Límites de confianza (95%) de los resultados**

Células (%)	Número de células contadas			
	100	200	500	1.000
0	0-4	0-2	0-1	0-1
1	0-6	0-4	0-3	0-2
2	0-8	0-6	0-4	1-4
3	0-9	1-7	1-5	2-5
4	1-10	1-8	2-7	2-6
5	1-12	2-10	3-8	3-7
6	2-13	3-11	4-9	4-8
7	2-14	3-12	4-10	5-9
8	3-16	4-13	5-11	6-10
9	4-17	5-15	6-12	7-11
10	4-18	6-16	7-14	8-13
15	8-24	10-21	12-19	12-18
20	12-30	14-27	16-24	17-23
25	16-35	19-32	21-30	22-28
30	21-40	23-37	26-35	27-33
35	25-46	28-43	30-40	32-39
40	30-51	33-48	35-45	36-44
45	35-56	38-53	40-50	41-49
50	38-61	42-58	45-55	46-54

## Bibliografía

1. Rümke CL. Imprecision of ratio-derived differential leukocyte counts. *Blood Cells* 1985; 11: 311-4.
2. Koepke J. Reference Leukocyte (WBC) Differential Count (Proportional) and Evaluation of Instrumental Methods; Approved Standard. 2nd ed. (H20-A2). Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI); 2007.
3. Davis B. Extended Differential Blood Count. International Council for Standardization in Haematology (ICSH). Meeting Minutes. General Assembly: Miami; May 2007.

## CITOLOGÍA

T. MOLERO, A. LEMES, S. DE LA IGLESIA

*Servicio de Hematología y Hemoterapia.*

*Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín.*

*Las Palmas de Gran Canaria*

En la última década se ha desatado una controversia sobre la necesidad y, en su caso, rentabilidad de la lectura manual de los frotis de la sangre periférica en un laboratorio de hematimetría de rutina. Ello se debe en parte a las recientes publicaciones al respecto, donde los autores documentan y cuestionan la utilidad del procedimiento del recuento diferencial. Los nuevos contadores hematológicos, que incorporan modernos métodos automatizados o semiautomatizados, pueden sustituir gran parte de la revisión manual de los frotis. Los métodos automatizados cada vez ofrecen mayor exactitud y precisión en el recuento diferencial y en las alarmas para la detección de formas patológicas o inmaduras, principalmente de los granulocitos, linfocitos y plaquetas, células que con mayor frecuencia pueden requerir una visualización microscópica.

Por otro lado, la lectura manual de los frotis alarga el tiempo de respuesta, incrementa los costes y disminuye la eficacia y la productividad del laboratorio<sup>1</sup>. El tiempo empleado en leer e interpretar 100-200 células en un frotis oscila entre 1,9 y 6 minutos, mientras que en el autoanalizador es de un minuto<sup>2</sup>.

El aumento de la presión asistencial y la incorporación de la analítica procedente de atención primaria a los hospitales ha supuesto una carga adicional para el hematólogo responsable de la sección de automatización o hematimetría, tanto en pruebas rutinarias como urgentes, creándose la necesidad de mejorar la eficacia para evitar la lectura innecesaria de muchos frotis.

La valoración de si debe ser el citólogo o el hematólogo responsable de rutina quien realice el recuento manual difiere entre los centros donde sólo se procesan los hemogramas del hospital y los que han incorporado los provenientes de atención primaria, independientemente del tamaño del hospital y de la población atendida en el área de salud. Así, en centros de primer nivel o en hospitales más grandes —donde se reciben muestras únicamente del centro—, el tiempo requerido para evaluar y observar al microscopio los frotis seleccionados es notablemente inferior al de los que procesan más de mil hemogramas diarios, donde indistintamente puede encargarse de su lectura el hematólogo de rutina o el citólogo.

El número de frotis a teñir depende también de que sea el hematólogo o el analista quien procese los hemogramas. La mayoría de los hematólogos somos

conscientes de ser los especialistas más idóneos para decidir qué tipo de autoanalizador utilizar según necesidades, y de cuándo, por qué o cuántos frotis debamos revisar.

En algunos centros, es el servicio de bioquímica o análisis clínicos el responsable de la automatización y, sobre todo, de los hemogramas que proceden de atención primaria, donde la alteración patológica de los hemogramas es generalmente irrelevante. En otros hospitales son las urgencias del laboratorio de hematología las que se procesan junto con la bioquímica en el servicio de análisis clínicos. Sin duda alguna, el hematólogo está bastante más preparado para decidir qué se tiñe, realizar el recuento manual y observar la morfología celular con exactitud para emitir un diagnóstico, porque es médico y conoce la patología en su forma integral, y no sólo datos de laboratorio<sup>3</sup>.

En cuanto a que sea el hematólogo o el técnico de laboratorio (TEL) el encargado de su lectura inicial, depende también de la disposición del personal de enfermería. Históricamente, las enfermeras leían las fórmulas hospitalarias, y aún se mantiene así en algunos laboratorios; pero no se consideró igual para los TEL, lo que ha causado más de una disputa en algunos centros.

También es importante tener en cuenta la experiencia del observador y el nivel del hospital. Así, cabe esperar que se revisen más extensiones en hospitales con docencia o donde el hematólogo de hematimetría no es un experto citólogo.

Se han definido reglas automatizadas de validación de hemogramas y revisión de frotis dependientes de la valoración del facultativo responsable de la sección y del tipo de autoanalizador utilizado. En el año 2002 se reunieron expertos en la materia, y publicaron unas reglas de consenso en la validación que han sido aceptadas por algunos grupos<sup>4</sup>. Es habitualmente aceptado eludir la lectura de los frotis si el paciente tiene anteriores hemogramas con el mismo parámetro alterado.

Las alarmas dispuestas en los autoanalizadores hematológicos son el primer punto de orientación para la tinción de las extensiones. Analizamos a continuación las alarmas que con más frecuencia nos pueden orientar hacia la selección de los frotis para su lectura manual.

---

### Alarmas en leucocitos

Las alarmas en los leucocitos son un motivo frecuente de revisión de frotis, ya sean alarmas que indican aumento o disminución del recuento total de leucocitos o en alguna de las células de la serie blanca.

## Linfocitos

Las alarmas de linfocitos que ofrecen los contadores son principalmente cuantitativas (alto o bajo recuento), pero aportan escasa información cualitativa (linfocitos variantes, LUC). En la misma zona del escategrama, y por similares características de dispersión de luz, pueden colocarse linfocitos neoplásicos o blastos de estirpe linfoide a mieloide. Es por ello que la mayor parte de los frotis seleccionados para su lectura manual son los correspondientes a las linfocitosis o alarmas en los linfocitos.

Además de las alarmas anteriormente comentadas, el hematólogo experto en hematimetría valora el informe gráfico del autoanalizador para seleccionar qué frotis se van a teñir para su posterior lectura microscópica. En algunos contadores que utilizan metodología óptica en el recuento diferencial leucocitario, basta con ver la gráfica de dispersión de luz (tamaño/lobularidad) para intuir que puede tratarse de una linfocitosis reactiva, lo que evita en muchos casos su análisis microscópico (Figura 1).

En un reciente estudio se enviaron frotis con un variable número de linfocitos atípicos para ser analizados manualmente por 30 expertos citólogos. En él se concluye que el recuento de linfocitos atípicos es diferente dependiendo del experto que los lea y de que tenga a su alcance los datos de las alarmas. Por ello, es preferible informar como “aumento” o “normal” evitando porcentajes<sup>5</sup>.

Si la imagen gráfica orienta hacia la presencia de blastos (independientemente de las alarmas de blastos) o hacia una linfocitosis clonal, habitualmente el

frotis se observará con distintos niveles de urgencia. Cuando se dispone de la posibilidad de detectar antígenos leucocitarios en el mismo autonalizador (Cell-Dyn 4000/Cell-Dyn Sapphire), se podrá determinar en un tiempo mínimo la estirpe linfocitaria y si se trata de una linfocitosis benigna o maligna con un simple panel de dos tubos con marcadores T, B y NK en dos fluorescencias<sup>6</sup> (Figura 2). Posteriormente, se enviará la muestra para estudio citofluorométrico y completar o confirmar el diagnóstico. Se ha observado una excelente correlación del método automatizado con el de referencia (citometría de flujo) para la detección de los linfocitos T y B, aunque inferior para los NK y T/NK<sup>7</sup>.

Asimismo, la edad de los pacientes es definitiva para decidir su normalidad, principalmente en los casos de linfocitosis y de desviación izquierda. En niños menores de 2 años y de entre 2 y 6 años, se puede considerar normal un recuento absoluto de linfocitos de hasta 9.000/ $\mu$ l y 7.000/ $\mu$ l, respectivamente<sup>8</sup>. Una vez más, la observación del informe gráfico del hemograma para el laboratorio puede evitar o forzar la visualización del frotis.

Otro motivo de revisión del frotis puede ser la neutropenia (recuento absoluto de neutrófilos < 1.000/ $\mu$ l) en la búsqueda de patología NK o T/NK (linfocitos grandes granulares), patología ésta más frecuente en adultos que en niños. En un reciente estudio de 97 pacientes con linfocitosis leve y moderada (rango 6-15  $\times 10^9$ /l) sin diagnóstico previo y procedentes de atención primaria, se encontró una expansión transitoria o persistente de células “natural killer” en un 22% de los adultos y en un 9% de los niños de edad inferior a 12 años<sup>6</sup>.

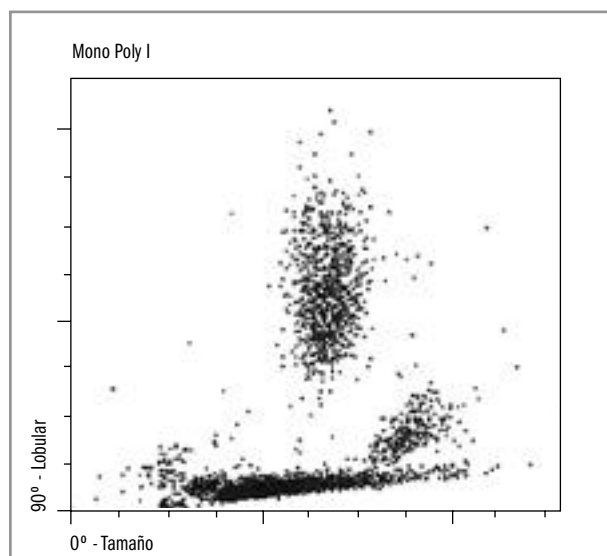


Figura 1a. Gráfica de dispersión de luz tamaño (0°)/lobularidad (90°) en una muestra de sangre periférica con linfocitos activados. Cell-Dyn Sapphire.

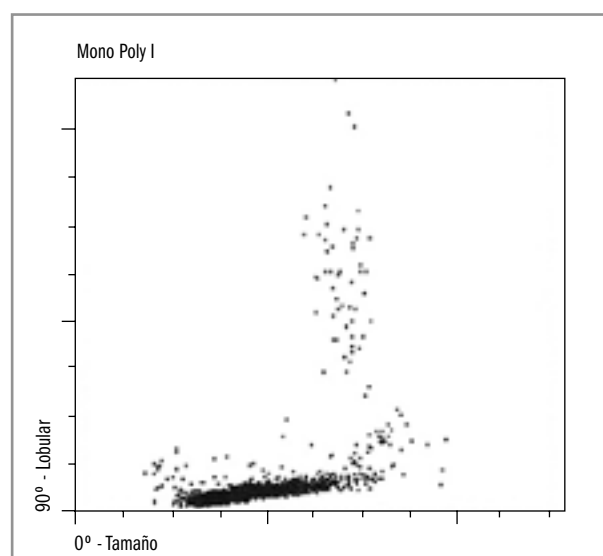
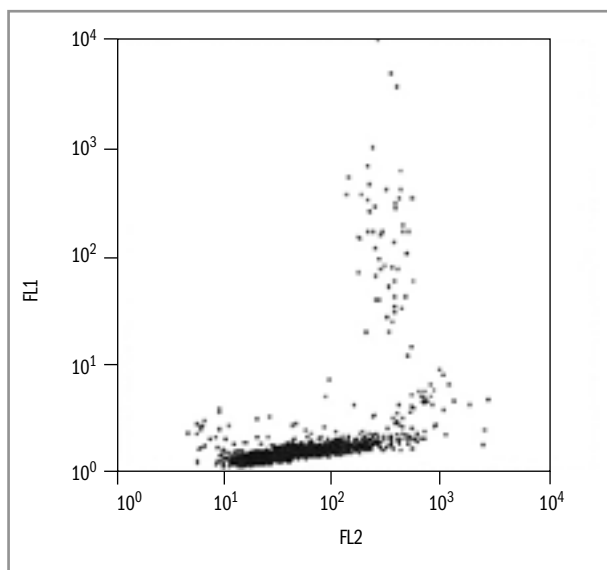
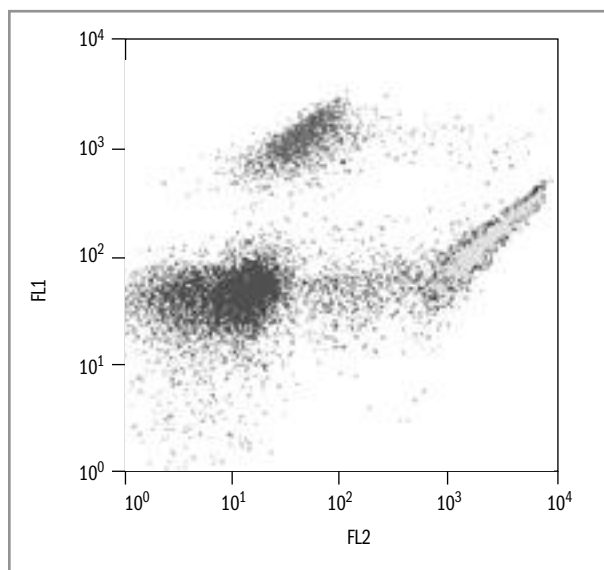


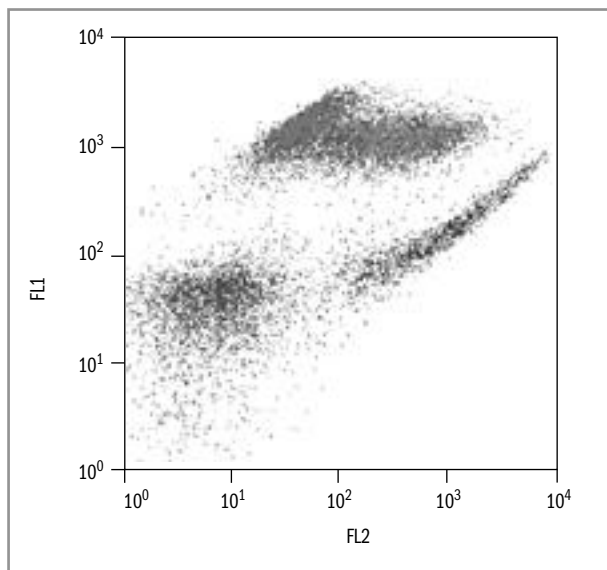
Figura 1b. Gráfica de dispersión de luz tamaño (0°)/lobularidad (90°) en una muestra de sangre periférica con linfocitos clonales en una leucemia linfocítica crónica. Cell-Dyn Sapphire.



**Figura 2a. Doble histograma de fluorescencia FL1 (CD3) versus FL2 (CD19/HLA-DR) en una muestra de sangre periférica normal. Cell-Dyn Sapphire.**



**Figura 2b. Doble histograma de fluorescencia FL1 (CD3) versus FL2 (CD19/HLA-DR) en una muestra de sangre periférica con aumento de linfocitos B (CD19+/HLA-DR+). Cell-Dyn Sapphire.**



**Figura 2c. Doble histograma de fluorescencia FL1 (CD3) versus FL2 (CD19/HLA-DR) en una muestra de sangre periférica con linfocitos T activados (CD3+/HLA-DR+). Cell-Dyn Sapphire.**

La información clínica siempre será de gran ayuda para decidir qué frotis seleccionar para su lectura.

### **Granulocitos inmaduros/bandas**

Las alarmas de bandas o granulocitos inmaduros pueden ser confirmadas en el microscopio, aunque el recuento de estas células ayuda poco en su principal fi-

nalidad, que es el diagnóstico del paciente infectado o séptico. Algunos autores cuestionan la utilidad del recuento de bandas como ayuda diagnóstica o en el seguimiento de una infección o fiebre, incluso en niños de edad inferior a 3 meses. Señalan que ofrecería similar información el número absoluto de leucocitos o de neutrófilos y se evitaría aumentar significativamente los costes del laboratorio<sup>9,10</sup>.

El recuento de las bandas es un método impreciso e inexacto. La reproducibilidad de éste depende del número de células contadas y de su inconsistente definición morfológica<sup>11,12</sup>. Esta falta de acuerdo en la identificación de los cayados se traduce en un amplio rango de valores de referencia tanto en los adultos como en los niños de diferentes edades y en distintas comunidades raciales, por lo que es complicado establecer sus valores normales<sup>10</sup>.

Como indicador de infección o de sepsis, se ha propuesto el estudio alternativo de los marcadores de activación de los granulocitos en el citómetro de flujo o en el mismo autoanalizador hematológico<sup>13,14</sup>. El análisis de la expresión del antígeno CD64 en la membrana de los neutrófilos como respuesta a la liberación de citocinas representa un aumento en la especificidad, sensibilidad y valor predictivo en el diagnóstico de sepsis o infección, con respecto al recuento de neutrófilos, recuento de bandas, fracción inmadura mieloide, alarmas del autoanalizador, proteína C reactiva o velocidad de sedimentación globular<sup>13,15</sup>.

En la misma línea, otros autores han estudiado el grado de maduración de los granulocitos por métodos citofluorométricos en tres fluorescencias y con

los antígenos CD45, CD16 y CD11b, valorando su distinta expresión en las formas madurativas, desde la negatividad para CD16 y CD11b hasta la expresión conjunta de ambos marcadores en el granulocito maduro. Comparando con la visualización microscópica y recuento de 100 células, la reproducibilidad en el recuento de granulocitos inmaduros varía desde un 6,8% en el método citofluorométrico hasta un 50,2% en recuento diferencial manual. Sin embargo, esta técnica es inservible en los casos de pacientes afectos de mielodisplasia o en tratamiento con factores de crecimiento<sup>16</sup>. Otros investigadores consideran similar el valor del análisis del CD16 en los neutrófilos al del recuento de granulocitos o alarmas en el autoanalizador en el diagnóstico de la fase aguda de la infección<sup>17</sup>.

Un estudio comparativo que valora la detección de granulocitos inmaduros (IG), realizado en el contador hematológico Sysmex XE 2100, mostró un coeficiente de variación del 7,02% para el %IG y de 6,93% para el recuento absoluto de granulocitos inmaduros, tomando como referencia el recuento citofluorométrico con los antígenos CD11b/CD16/CD45 y el recuento manual, respectivamente. El coeficiente de correlación fue  $r^2 = 0,96$  con la citometría de flujo y  $r^2 = 0,78$  con el recuento manual<sup>18</sup>.

Recientemente se ha comunicado la superioridad (mayor sensibilidad y especificidad) de los parámetros VCS MNV (volumen de neutrófilos) y NDW (ancho de distribución de neutrófilos) en el diagnóstico de la infección aguda, al compararlo con el recuento absoluto de neutrófilos, recuento manual de bandas y PCR, en un estudio practicado en 212 adultos con distintos grados de infección (ausente, localizada y grave), analizándose las muestras en el Coulter LH 75019.

## Blastos

Las alarmas de blastos de los contadores pueden representar cierta fiabilidad si el porcentaje de certeza supera el 90%. Una vez más, la imagen de dispersión de luz es más orientadora que las alarmas. El resto de los parámetros del hemograma ayudan al posible diagnóstico de la presencia de blastos en una muestra de sangre periférica. La información clínica será fundamental en la decisión de revisar la extensión.

Como en toda patología hematológica, será diferente su proceso en el caso de pacientes en seguimiento por una leucemia aguda, en el que los requerimientos del clínico orientarán a menudo sobre la necesidad de la observación microscópica del frotis, o bien se establece en cada centro su frecuencia de lectura manual.

## Eosinófilos, basófilos, monocitos

Raramente es necesaria la confirmación de los eosinófilos y monocitos, puesto que su especial dispersión de la luz ofrece escasa confusión con otro tipo celular. Los contadores hematológicos de última generación distinguen con gran exactitud estos tipos celulares.

Como en todo diagnóstico es fundamental tener en cuenta los datos clínicos y demográficos aportados en la solicitud del hemograma.

El recuento de basófilos es el más inexacto en los autoanalizadores hematológicos, exceptuando los que utilizan tinciones citoquímicas y lisis ácida de la muestra en su resolución (Advia). No obstante, su confirmación microscópica será necesaria casi exclusivamente en el diagnóstico y seguimiento de los síndromes mieloproliferativos, en los que el resto de los parámetros obligará igualmente a su estudio global.

En la serie blanca en general, es más importante la visualización del frotis para observar la morfología de las células que para efectuar su recuento diferencial. Es interesante valorar la viabilidad automatizada para excluir patología o mal estado de la muestra por largo tiempo tras la extracción.

## Plaquetas

En la decisión de revisión microscópica de las plaquetas, la mayoría de los autoanalizadores reflejan con notable exactitud la presencia de agregados, por lo que, bajo nuestro punto de vista, habitualmente no es preciso comprobar su presencia en el microscopio (Figura 3). Únicamente habría que revisar el frotis cuando el volumen plaquetario es muy alto y el contador puede dar falsa alarma de agregados o de trombocitopenia.

En caso de disparidad entre el recuento de plaquetas por el método óptico e impedancia debida a interferencias de partículas celulares (microorganismos, parásitos, inmunocomplejos, crioglobulinas, etc.), se puede realizar la lectura manual, porque permite además la visualización morfológica de las partículas que causan la interferencia y del resto de las células. En el recuento plaquetario es más exacta y eficaz la determinación inmunológica por citometría de flujo o, si está disponible, la determinación de la GPIIIa plaquetaria (CD61) automatizada, que guarda una excelente correlación con el recuento citofluorométrico<sup>20,21</sup>. El recuento manual de plaquetas en la trombocitopenia es un método altamente impreciso y tedioso, principalmente en bajos recuentos de plaquetas o en pacientes en los que además se detecta leucopenia<sup>22,23</sup>.

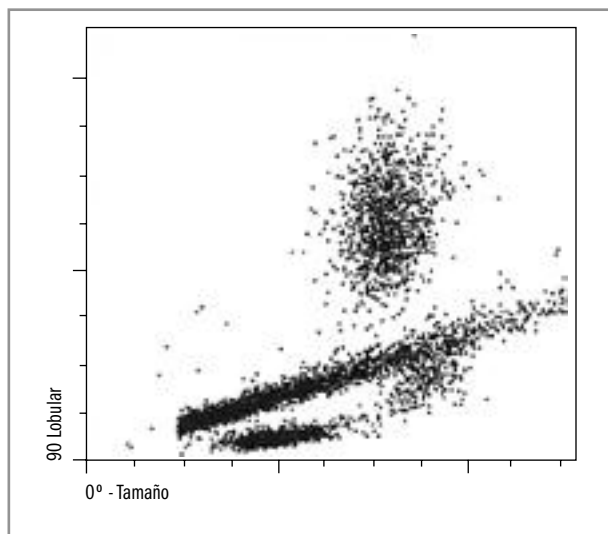


Figura 3. Imagen de agregados de plaquetas en el doble histograma tamaño (dispersión de luz a 0°)/lobularidad (90°). Cell-Dyn Sapphire.

## Hematíes/eritroblastos

En las alteraciones de la serie roja, la patología que con más frecuencia obliga a la visualización microscópica es el recuento de eritroblastos (EB), principalmente en neonatos, talasemia mayor e intermedia, anemia hemolítica, hemorragia grave o estados de hipoxia, aunque los contadores de última generación ofrecen un recuento de eritroblastos ajustado. Los EB interfieren el recuento leucocitario, dando lugar a resultados erróneos si no se ajustan previamente sus contajes. Algunos autoanalizadores utilizan métodos con tinción vital del núcleo una vez realizada la lisis de los eritrocitos y eritroblastos (Sysmex XE 2100, Cell-Dyn 4000/Sapphire), encontrándose una buena correlación con el recuento manual. Se ha propuesto el recuento de EB con métodos inmunológicos con el CD71 y CD45 en combinación; pero es un método que lleva tiempo de preparación y análisis, precisando además procesar mayor cantidad de sangre en su procedimiento<sup>24</sup>.

Las alteraciones morfológicas de los hematíes (microcitosis, macrocitosis, aumento del ancho de distribución, etc.) suelen requerir un estudio de anemia, y serán los hematólogos expertos en anemias quienes las estudiarán posteriormente.

Cuando existe una sospecha clínica de síndrome hemolítico urémico o púrpura trombótica trombocitopénica, suele ser el clínico quien pedirá su exclusión y recuento sistematizado.

El mismo autoanalizador avisa del requerimiento de adquirir la muestra por el canal de rojo resistente cuando aparecen anomalías de la lisis de los hematíes (dia-

nocitos, hematíes falciformes, acantocitos, esferocitos), que ocasionan además una falsa leucocitosis.

## Microorganismos y parásitos

La presencia de parásitos intracelulares o extracelulares puede causar interferencias o producir una falsa alarma de agregados plaquetarios o disparidad entre los recuentos por método óptico e impedancia del canal plaquetario<sup>25</sup>.

La sospecha clínico-biológica de la existencia de parásitos debe confirmarla un citólogo experto y revisarla con la frecuencia que se crea necesaria (por ejemplo, recuento de parásitos *P. falciparum*).

La detección del pigmento palúdico es posible en algunos autoanalizadores, aunque sin aviso de alarma disponible actualmente (Cell-Dyn 4000/Sapphire).

Muchos otros parásitos o microorganismos patógenos pueden visualizarse en el frotis de la sangre periférica con una simple tinción panóptica (borrelia, leishmania, bacterias, hongos, etc.), y se investigarán conforme a requerimientos clínicos.

La observación de algunos microorganismos (estafilococos, estreptococos, *Capnocytophaga canimorsus*) en la sangre periférica es rara, y se asocia con frecuencia a sepsis, por lo que su detección precoz puede ser importante para la rápida prescripción de los antibióticos adecuados. La presencia de microorganismos puede deberse a contaminación del tubo, por lo que debe excluirse en el diagnóstico de la infección<sup>25,26</sup>.

En un reciente estudio multicéntrico donde se examinaron 95.141 hemogramas de distintos hospitales y países, las causas de revisión o recuento diferencial del frotis fueron alarmas en blancos en el 36,7%, seguidas de alarmas en inmaduros, rojos y plaquetas, con un 25,5%, 13% y 5,9% respectivamente. El requerimiento del clínico fue del 3,7%. El porcentaje de frotis revisados fue variable en los distintos centros participantes<sup>1</sup>.

En el análisis inicial de una encuesta cumplimentada por hematólogos de 56 hospitales españoles, se observa que la mayoría de los encuestados (44,6%) realizan el recuento manual de los frotis en el 1-5% de las muestras procesadas en el laboratorio de rutina. El 42,8% leen entre un 6 y un 10%; y el 12,4% restante, más del 10%. El motivo más frecuente de lectura de frotis fue la linfocitosis (59,2%) y alarmas en blancos (70,3%), seguido de agregados plaquetarios (42,5%) y alarmas en rojos (16,6%).

En el laboratorio de urgencias se valoraron únicamente 47 centros, ya que en 9 de los encuestados esta función la asumía el servicio de análisis clínicos. De los que analizaban las urgencias en el laboratorio de hematología, el 59,5% realizaba el recuento diferen-

cial en el 1-5% de las muestras; el 19,2%, entre 6 y 10%; y el 21,2%, más del 10%.

En ellos se excluyen los pacientes hematológicos o sometidos a quimioterapia y/o radioterapia, cuya lectura depende de la sistemática de cada hospital.

Son los TEL los que leen las fórmulas leucocitarias en el 35,7 y 53,5% en rutina y urgencias, respectivamente; en el 42,8% el hematólogo de rutina y en el 10,7% el citólogo. En urgencias es el hematólogo de guardia quien lee los frotis en el 30,3% de los casos (datos preliminares no publicados).

## Conclusiones

En resumen, se podría recomendar la lectura manual de los frotis en los siguientes casos:

- Linfocitosis. Dependiendo de la edad, según el gráfico de dispersión de luz y datos clínicos. En recuentos superiores a  $5-6 \times 10^9/L$  en adultos o en neutropenias. Si es posible, se realizará la determinación inmunológica de antígenos de membrana para un despistaje inicial.
- Alarma de agregados de plaquetas. No precisa confirmación en la mayoría de los casos.
- Trombocitopenia. Realizar el recuento inmunológico automatizado si procede (cuando no sea conocida o si no concuerda con el diagnóstico aportado por el clínico).
- Alarmas de bandas o granulocitos inmaduros. Habitualmente no es necesario el recuento manual. Si se considera necesario y es factible, realizar la determinación inmunológica del CD64 en la membrana de los granulocitos y aconsejar otras determinaciones para descartar una infección o sepsis.
- Siempre que exista una sospecha clínica de hemopatía, anemia hemolítica, microangiopática o parásitos, realizar la visualización a demanda del clínico.
- En el seguimiento de los pacientes trasplantados o en tratamiento con citostáticos, según requerimiento clínico y con la frecuencia que tenga estipulada cada centro.
- En todos los casos, la información clínica puede variar la decisión de revisión de los frotis.

## Bibliografía

1. Novis DA, Walsh M, Wilkinson D, St Louis M, Ben-Ezra J. Laboratory productivity and the rate of manual peripheral blood smear review. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 596-601.
2. Pierre RV. Peripheral blood review. The demise of the eyecount leukocyte differential. *Clin Lab Med* 2002; 22: 279-97.
3. Jou JM, Pérez Sirvent ML, Salinas R, Soto R, Villarrubia J. El laboratorio de hematología del año 2000. Documento Marco de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia. Barcelona: Acción Médica; 1998.
4. Barnes PW, McFadden SL, Machin SJ, Simson E. International consensus group for haematology. The international consensus group for haematology review: suggested for action following automated CBC and WBC differential analysis. *Lab Hematol* 2005; 11: 83-90.
5. Van der Meer W, Scott CS, Keijzer MH. Automated flagging influences the inconsistency and bias of band cells and atypical lymphocyte morphological differentials. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 371-7.
6. Molero T, Lemes A, De la Iglesia S, Scott CS. Monoclonal antibody fluorescence for routine lymphocyte subpopulation analysis with the Abbott CELL-DYN Sapphire haematology analyser. *Int J Lab Hem* 2007; 29 (en prensa).
7. Molero T, Roemer B, Perera MM, Lemes A, De la Iglesia S, Palacios G, Scott CS. Analysis and enumeration of T cells, B cells and NK cells using the monoclonal antibody fluorescence capability of a routine haematology analyser. *Clin Lab Haem* 2005; 27: 224-34.
8. Shearer WT, Rosenblatt HM, Gelman RS, Oyomopito R, Plaeger S, Stiehn ER, et al. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: The Pediatric AIDS Clinical Trial Group P1009 study. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 112: 973-80.
9. Cornbleet PJ, Novak RV. Lack of reproducibility of band neutrophil identification despite the use of uniform identification criteria. *Lab Hematol* 1995; 1: 89-96.
10. Cornbleet PJ. Clinical utility of the band count. *Clin Lab Med* 2002; 22: 101-36.
11. Novak RW. The beleaguered band count. *Clin Lab Med* 1993; 13: 893-5.
12. Van der Meer W, Van Gelder W, De Keitzer R, Williams H. Does the band cells survive the 21<sup>st</sup> century? *Eur J Haematol* 2006; 76: 251-4.
13. Davis BH, Bigelow NC. Comparison of neutrophil CD64 expression, manual myeloid immaturity counts, and automated hematology analyzer flags as indicator of infection and sepsis. *Lab Hematol* 2005; 11: 137-47.
14. Van der Meer W, Van Dun L, Gunnewiek JK, Roemer B, Scott CS. Simultaneous determination of membrane CD64 and HLA-DR expression by blood neutrophils and monocytes using the monoclonal antibody fluorescence capability of a routine haematology analyser. *J Immunol Methods* 2006; 311: 207-19.
15. Davis BH, Olsen SH, Ahmad E, Bigelow NC. Neutrophil CD64 is an improved indicator of infection or sepsis in emergency department patients. *Arch Pathol Lab Med*. 2006; 130: 654-61.
16. Fujimoto H, Sakata T, Hamaguchi Y, Shig S, Tohyama K, Ichiyama S, et al. Flow cytometric method for enumeration and classification of reactive immature granulocyte populations. *Cytometry* 2000; 42: 371-8.
17. Hubl W, Andert S, Thum G, Ortner S, Bayer PM. Value of neutrophil CD16 expression for detection of left shift and acute-phase response. *Am J Clin Pathol* 1997; 107: 187-96.
18. Briggs C, Kunka S, Fujimoto H, Hamaguchi Y, Davis BH, Machin SJ. Evaluation of immature granulocytes counts by the XE-IG master: upgraded software for the XE-2100 automated haematology analyzer. *Lab Hematol* 2003; 9: 117-24.
19. Bagdasaryan R, Zhou Z, Tierno B, Rosenman D, Xu D. Neutrophil VCS parameter are superior indicator for acute infection. *Lab Hematol* 2007; 13: 12-6.
20. Kunz D, Kunz WS, Scott CS, Gressner AM. Automated CD61 immunoplatelet analysis of thrombocytopenic samples. *Br J Haematol*. 2001; 112: 584-92.



21. Von Ahsen N, Ehrlich B, Scott CS, Riggert J, Oellerich M. Cryoglobulins interfere with platelet counts by optical and impedance methods but not with the CD61 immunoplatelet count. *Clinical Chemistry* 2001; 47: 1858-60.
22. Sutor AH, Grohmann A, Kaufmehl K, Wundisch T. Problems with platelet counting in thrombocytopenia. A rapid method to measure low platelet counts. *Semin Thromb Haemost* 2001; 27: 237-43.
23. Molero T, Lemes A, De la Iglesia S, Santana A. Nuevos índices plaquetarios: valor en el diagnóstico y trascendencia en las decisiones terapéuticas. *Haematologica* (ed. esp.) 2002; 87: 115-20.
24. De Keitzer MH, Van der Meer W. Automated counting of nucleated red blood cells in blood samples of newborns. *Clin Lab Haem* 2002; 24: 343-5.
25. Molero T, Lemes A, De la Iglesia S. Staphylococous contamination of a blood sample mimicking platelet clumps. *Haematologica* 2000; 85: 1098.
26. Van der Meer W, Verviel JMM, Gidding CEM, De Metz M, De Keijzer MH. Bacteria in blood smears: overwhelming sepsis or trivial contamination. *Acta Hematologica* 2002; 107: 220-3.

## **CITOMETRÍA. REVISIÓN DEL RECuento DIFERENCIAL LEUCOCITARIO AUTOMATIZADO**

**J. VILLARRUBIA, J.L. VELASCO, R. NÚÑEZ**  
*Servicio de Hematología y Hemoterapia.*  
*Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid*

Los primeros intentos de automatización del recuento diferencial leucocitario tuvieron lugar a principios de los años 70 del siglo XX, pero no fue hasta mediados de los 80 cuando se generalizó su uso. Hasta entonces, el recuento diferencial leucocitario se hacía de forma manual, que resultaba ser un método caro, lento, impreciso, inexacto y tedioso que precisaba de un gran gasto de tiempo por personal muy cualificado (el tiempo medio para la realización de un diferencial manual sobre un recuento de 100 células se estima entre 2 y 6 minutos). Al principio se utilizaron técnicas de procesamiento de imagen, que poco después fueron sustituidas por las técnicas de flujo, que son las que se utilizan en la actualidad.

Hoy en día, los analizadores hematológicos nos dan los recuentos de las cinco poblaciones leucocitarias (tanto en porcentaje como en valor absoluto), así como diferentes alarmas morfológicas de sospecha (bandas, granulocitos inmaduros, linfocitos atípicos y blastos). Estas alarmas pueden variar según el analizador, pero, básicamente, se reducen a las señaladas. La presencia de eritroblastos puede ser informada como una alarma de sospecha o ser cuantificada, según el analizador empleado. Estas alarmas morfológicas de sospecha nos informan de que la muestra tiene una serie de células que el analizador no pue-

de contar y, en caso de que queramos saber su cifra exacta, deberán ser contadas de forma manual o por otro método. Además, el analizador informa de otras alarmas (agregados plaquetarios, hematíes no lisados, interferencia de leucocitos, etc.) que pueden interferir con el diferencial leucocitario. Cuando aparece alguna de estas alarmas, lo más habitual es hacer una extensión de sangre periférica y realizar un recuento manual, informando además de las anomalías morfológicas observadas en la preparación. Es sabido que los sistemas automáticos son superiores para el recuento de leucocitos, hematíes y plaquetas, así como para el diferencial leucocitario, siempre y cuando éste esté constituido por células bien diferenciadas; mientras que la revisión al microscopio es superior cuando se trata de células anormales o poco diferenciadas. Desde hace años ya no es necesario realizar revisiones al microscopio de la mayoría de muestras analizadas, quedando éstas reservadas sólo para muestras que presentan alguna alarma específica. La continua presión para reducir los costes en los laboratorios clínicos está obligando a reducir el personal y la formación de éste, ya que se tiende a que cada técnico sea capaz de trabajar en diferentes áreas del laboratorio, por lo que cada vez tenemos menos personal y menos cualificado para áreas concretas. Esto nos obliga a reducir el número de revisiones manuales sin sacrificar la calidad de los resultados. Ello, a su vez, implica la necesidad de que el laboratorio tenga claramente establecidos los criterios de revisión y validación de los hemogramas, así como los métodos alternativos para la comprobación de los resultados. La revisión del frotis de sangre periférica es el principal método complementario del hemograma automatizado, ya que proporciona información adicional o ratifica la del analizador. Hoy en día, la mayoría de los hemogramas no necesitan la revisión al microscopio ni el recuento manual del diferencial. Hasta hace poco, cada laboratorio tenía sus criterios de revisión y validación del diferencial leucocitario, siendo éste muy variable según las entidades de que se tratase. En el año 2002, el Grupo Internacional de Consenso para la Revisión del Hemograma estableció las normas de revisión y validación del hemograma. En lo que se refiere al diferencial leucocitario, establece los criterios de revisión según sea la primera vez que se estudia al paciente o si es ya conocido, y fija los criterios por valores absolutos, alarmas de sospecha, edad y *delta check* (Tabla 1). Estos criterios de revisión van dirigidos al personal del laboratorio, pero la oportunidad de que un clínico pueda solicitar un frotis debe mantenerse, ya que éste conoce datos de la historia clínica del paciente que nosotros no tenemos y que pueden pasar desapercibidos para el analizador. Ahora bien, el clínico deberá justificar la petición del frotis y comunicará a la persona que lo vaya a leer todos los

datos que crea que son de interés para su correcta interpretación.

El objetivo final consiste en reducir al mínimo el número de muestras a las que hay que realizar un frotis, sin que por ello disminuya la calidad de los resultados. Para esto, es necesario convencer a los clínicos de que la validación de los resultados en el laboratorio implica una revisión exhaustiva de todos los hemogramas y la realización de un frotis en aquellos casos que se considere necesario. Esto es más sensible y exacto para la detección de patologías que la realización rutinaria de frotis de todas las muestras por parte de los técnicos. Los clínicos deben reconocer que la realización diaria del diferencial leucocitario o en intervalos de menos de una semana no es necesaria en la mayoría de los casos.

Hasta ahora, la observación del frotis al microscopio era la única manera de identificar las células sanguíneas anormales. Pero la información que nos aporta el frotis es, en muchos casos, insuficiente. La sangre periférica es el lugar de paso entre la médula ósea y los tejidos, donde los leucocitos, especialmente los neutrófilos y los monocitos, realizan su función. También es el lugar de paso de los linfocitos en su recirculación y redistribución, una vez que reciben las instrucciones de las células procesadoras de antígenos en los tejidos, permitiendo que estas células modificadas lleguen a los lugares donde ejercerán su función. La morfología celular y las características tintoriales dicen poco sobre el estadio de maduración y las capacidades funcionales de los leucocitos. En muchas ocasiones, uno no puede diferenciar entre cayados y segmentados o entre un linfocito B y uno T si no es utilizando la microscopia convencional. No se puede decir si un granulocito maduro corresponde a un paciente con una leucemia mieloide crónica o a un neutrófilo maduro normal. Es necesario desarrollar técnicas que nos permitan identificar mejor los diferentes estadios de maduración celular y asociarlos con capacidades funcionales específicas, y la citometría de flujo parece ser la técnica que se va imponiendo. La naturaleza neoplásica de algunos leucocitos aparentemente normales precisa de técnicas especiales para su identificación (hibridación *in situ*, citometría de flujo), no siendo posible, en la mayoría de los casos, su realización en los laboratorios clínicos de rutina. Con los rápidos avances para entender la naturaleza y la capacidad funcional de los leucocitos, el tradicional recuento y observación del diferencial leucocitario al microscopio puede ser el pasado, y quizá pase a la historia dentro de poco tiempo. El desarrollo de nuevas técnicas de laboratorio nos dará más información acerca de la naturaleza y funcionalidad de las células hematológicas.

El concepto de fórmula expandida en los analizadores hematológicos automatizados consiste no sólo en

informar de las alarmas morfológicas de sospecha (cayados, granulocitos inmaduros, linfocitos atípicos y blastos), sino en dar su valor numérico. Hasta ahora, los analizadores hematológicos pueden informar de estos datos en sus pantallas de investigación o de laboratorio, pero estos resultados no pueden ser comunicados al clínico de manera directa. Es por esto que nos ofrecen muy poca información sobre las poblaciones linfocitarias, la etiología y el significado de la neutrofilia o la posible estirpe de las células atípicas o inmaduras de las patologías hematológicas malignas. Los anticuerpos monoclonales han sido ampliamente utilizados para definir y enumerar las distintas poblaciones de leucocitos, tanto normales como anormales, y proporcionarnos un inmunodiferencial leucocitario. Los laboratorios de hematología general se enfrentan continuamente a muestras con linfocitosis o alteraciones de neutrófilos, bien por su número o por su morfología. Esto implica que después de la realización de un frotis deberíamos enviar la muestra a un laboratorio de citometría, por lo que el laboratorio de hematología no podría comunicarle al clínico el significado de estas alteraciones hasta mucho tiempo después.

En los últimos años, hemos visto cómo algunos analizadores hematológicos han empezado a incorporar la utilización de los anticuerpos monoclonales en sus estudios rutinarios. Así, es posible la realización del recuento de plaquetas por métodos inmunológicos (CD61) y el estudio de las poblaciones linfocitarias CD3/CD4/CD8 en analizadores de rutina. Basándose en estos estudios, se han podido sustituir estos anticuerpos monoclonales por otros, permitiendo realizar casi cualquier tipo de estudio inmunológico en un analizador hematológico. Así, se han realizado estudios de las diferentes poblaciones linfocitarias (linfograma), de los diferentes estadios de maduración de la serie mieloide, de identificación y recuento de las células progenitoras, así como de identificación de plaquetas y de antígenos eritrocitarios. La aplicación de estos métodos hematológicos en la hematimetría de rutina nos va a permitir el estudio de los recuentos anómalos de linfocitos, linfopenia y linfocitosis, la diferenciación de los procesos malignos y reactivos, el estudio de la naturaleza de los linfocitos morfológicamente anormales que vemos en los frotis y la monitorización y recuento de las distintas subpoblaciones linfocitarias durante los tratamientos.

De forma similar, los marcadores mieloides pueden servir para el estudio de las anomalías morfológicas de la serie mieloide (mielodisplasia, síndromes mieloproliferativos, neutrofilias reactivas, etc.), así como los cambios de expresión asociados a inflamación, infección o sepsis. La información obtenida con el uso de anticuerpos monoclonales en los analizadores hematológicos de rutina supone una significativa mejora en la eficiencia del laboratorio.

Uno de los grandes problemas de la hematimetría ha sido el diagnóstico de la sepsis en determinados casos. Hasta ahora, los marcadores clásicos de la infección han sido leucocitosis con neutrofilia, aumento de cayados, granulocitos inmaduros circulantes y cambios tóxicos en los neutrófilos. El problema es que ninguno de estos marcadores es específico de infección o no está presente en todos los casos. Así, la neutrofilia es altamente sugestiva de infección, pero existen infecciones con neutropenia; los cayados o bandas tienen un valor limitado en muchos casos de infección; los granulocitos inmaduros tienen una baja discriminación en algunos grupos de pacientes y, además, no es-

tán presentes en muchos casos; y los cambios tóxicos están ausentes frecuentemente. Además, estos cambios hematológicos están ausentes de forma casi sistemática en varios grupos de pacientes, como son niños y neonatos, ancianos, pacientes sometidos a quimioterapia y radioterapia.

Un punto aparte merece el recuento de cayados en el frotis de sangre periférica. El reconocimiento de un neutrófilo como cayado o neutrófilo maduro, en muchas ocasiones, es muy subjetivo. El nivel de concordancia entre observadores experimentados para el recuento de cayados es de menos del 50%; incluso intraobservador, el resultado es muy poco concor-

**Tabla 1. Guía de consenso para la revisión de hemogramas. Reglas para revisión de los leucocitos y del diferencial leucocitario (I)**

Rule #	Parameter	Primary	and/or	Secondary	and/or	Tertiary	and/or	fourth	Action 1	Action 2	Action 3
2	WBC, RBC, HGB, PLT, Retics	Exceeds linearity							Dilute sample and rerun		
3	WBC, PLT	Lower than Lab verified instrument linearity							Follow lab SOP		
4	WBC, RBC, HGB, PLT	Vote Out							Check sample for clot	Rerun sample	If persists, perform alternate counting method
5	WBC	< 4.0 or > 30.0	and	first time					Slide Review		
6	WBC	< 4.0 or > 30.0	and	delta failed	and	within 3 days			Slide Review		
16	No diff or incomplete diff								Manual Diff and Slide Review		
17	Neut #	< 1.0 or > 20.0	and	first time					Slide Review		
18	Lymph #	> 5.0 (adult) or > 7.0 (< 12 yrs old)	and	first time					Slide Review		
19	Mono #	> 1.5 (adult) or > 3.0 (< 12 yrs old)	and	first time					Slide Review		
20	Eos #	> 2.0	and	first time					Slide Review		
21	Baso #	> 0.5	and	first time					Slide Review		
22	NRBC #	any value	and	first time					Slide Review		

dante. Por estas razones, cada vez es más necesario buscar otras alternativas diagnósticas ante la sospecha de infección o sepsis. Se han propuesto varios parámetros, tales como proteína C reactiva, procalcitonina, etc. Pero, además de la dificultad que supone su realización en laboratorios generales, sus resultados, frecuentemente, no son concluyentes o llegan demasiado tarde.

Quizá el marcado inmunológico que antes veríamos incorporado a la hematimetría de rutina para el diagnóstico de infección sea el CD64. Este receptor de alta afinidad para la IgG (FcγRI) es expresado de forma muy débil en los neutrófilos maduros

y aumenta considerablemente ante una infección o una inflamación. Presenta grandes ventajas desde el punto de vista analítico, como son su baja expresión en sujetos sanos y su rápido aumento cuando es estimulado por citocinas inflamatorias; que puede medirse en muestras anticoaguladas durante más de 30 horas a temperatura ambiente y en más de 72 horas cuando son refrigeradas; que se precisa muy poco volumen de sangre; que su aumento tiene una alta correlación con la presencia de sepsis, infección o inflamación sistémica aguda; que puede ser de gran utilidad para monitorizar el uso de antibióticos; que funciona en pacientes de todas las

**Tabla 1. Guía de consenso para la revisión de hemogramas. Reglas para revisión de los leucocitos y del diferencial leucocitario (II)**

Rule #	Parameter	Primary	and/or	Secondary	and/or	Tertiary	and/or	fourth	Action 1	Action 2	Action 3
24	Suspect flag (except ImmG/Band)	Flag +	and	first time	and	adult			Slide Review		
25	Suspect flag	Flag +	and	first time	and	child			Slide Review		
26	WBC unreliability Flag	Flag +	any						Check sample integrity and rerun sample	If persists, review instrument output	Slide review with manual diff if indicated
32	Immature granulocyte flag	Flag +	and	first time					Slide Review		
33	Immature granulocyte flag	Flag +	and	previous confirmed result	and	positive delta fail for WBC			Slide Review		
34	Left shift flag	Flag +							Follow lab SOP		
35	Atypical/Variant lymphs	Flag +	and	first time					Slide Review		
36	Atypical/Variant lymphs	Flag +	and	previous confirmed result	and	positive delta fail for WBC			Slide Review		
37	Blast flag	Flag +	and	first time					Slide Review		
38	Blast flag	Flag +	and	previous confirmed result	and	delta pass or negative delta for WBC	and	within 3-7 days	Follow lab SOP		
39	Blast flag	Flag +	and	previous confirmed result	and	positive delta fail for WBC			Slide Review		
40	NRBC flag	Flag +							Slide Review	If positive, enumerate NRBC count, correct WBC if appropriate	

edades, incluso en inmunodeprimidos, que son capaces de regular su producción; y que, por último, no se afecta en casos de leucemia mieloide crónica, síndromes mielodisplásicos, anemia megaloblástica, embarazo o uso de corticoides. En la actualidad, se está empezando a utilizar en analizadores hematológicos de rutina, utilizando un preparado comercial (Leuco64-H), y es posible que en breve sea una herramienta de rutina que sustituya al ya caduco recuento de cayados.

Lo que no debemos olvidar es que el objetivo final del laboratorio de hematimetría es realizar de manera correcta cientos de hemogramas al día (a veces, miles) y que el tratamiento de cada muestra debe hacerse de forma individualizada. Deberemos tener automatizada, en la medida de lo posible, la realización de los hemogramas, pero sobre todo su revisión y su validación, que deberán permitirnos la validación automática de todas las muestras que no precisen confirmación y centrarnos en los hemogramas patológicos, que deberemos confirmar o completar en la medida que nos permitan las posibilidades de nuestro laboratorio.

## Bibliografía

- Barnes PW, McFadden SL, Machin SJ, Simson E. Internacional consensus group for haematology. The International Consensus Group for Haematology review: suggested for action following CBC and WBC differential analysis. *Lab Hematol* 2005; 11 (2): 83-90.
- Cornbleet PJ. Clinical utility of the band count. *Clin Lab Med* 2002; 22 (1): 101-36.
- Davis BH, Bigelow NC. Comparison of neutrophil CD64 expression, manual myeloid immaturity counts and automated haematology analyzer flags as indicator of infection and sepsis. *Lab Hematol* 2005; 11 (2): 137-47.
- Johannessen B, Roemer B, Flatmoen L, Just L, Aarsand AK, Scott CS. Implementation of monoclonal antibody fluorescence on the Abbott CELL-DYN Sapphire haematology analyser: evaluation of lymphoid, myeloid and platelet markers. *Clin Lab Haematol* 2006; 28 (2): 84-96.
- Molero T, Roemer B, Perera MM, Lemes A, De la Iglesia S, Palacios G, Scout CS. Analysis and enumeration of T cells, B cells and NK cells using the monoclonal antibody fluorescent capability of a routine haematology analyser. *Clin Lab Haem* 2005; 27: 224-34.
- Novis DA, Walsh M, Wilkinson D, St Louis M, Ben-Ezra J. Laboratory productivity and the rate of manual peripheral blood smear review. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 596-601.
- Pierre RV. Peripheral blood review. The demise of the eyecount leukocyte differential. *Clin Lab Med* 2002; 22 (1): 279-97.