

# Validação de um novo método para estimacão de contagens plaquetárias baixas: método G&S

## *Validation of a new method for estimating low platelet counts: G&S method*

Gian Carlos Ramirez-Ubillus<sup>1</sup>; Carlos Ricardo Neira-Montoya<sup>2</sup>; Eduardo Eulogio Sedano-Gelvet<sup>2</sup>; Joel Fernando Verona-Cueva<sup>2</sup>

1. San Bartolomé Mother-Child National Teaching Hospital, Lima, Peru. 2. Hospital María Auxiliadora, Lima, Peru.

### RESUMO

**Introdução:** Os analisadores automatizados hematológicos são capazes de realizar baixas contagens de plaquetas com precisão e exatidão. No entanto, esses analisadores podem produzir contagens erradas devido à presença de interferências. Dessa forma, métodos adicionais são necessários para confirmar as contagens de plaquetas, como esfregaço de sangue e uma contagem direta, utilizando a câmara de Neubauer. **Objetivo:** Validar a confiabilidade gerada pela estimativa do método G&S. **Material e método:** Cento e cinquenta contagens de plaquetas foram analisadas nos laboratórios de hematologia e emergência do Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé em Lima, Peru, por quatro metodologias: uma contagem óptica de plaquetas (PLTO), uma contagem indireta por esfregaço de sangue (Indireto) e duas contagens diretas (Direto e G&S). Estatísticas descritivas e inferenciais foram utilizadas para comparar os grupos. **Resultados:** Observou-se diferença significativa na distribuição das quatro metodologias e, após a aplicação da análise post-hoc, obteve-se semelhança entre os métodos PLTO e G&S. Além disso, os métodos Direto, G&S e Indireto mostraram correlação positiva com o método PLTO. O teste de Bland-Altman demonstrou que o método G&S apresentou alta concordância com o método PLTO. **Conclusão:** O método G&S é barato, fácil de executar e demonstrou confiabilidade estatística em relação à metodologia automatizada, sendo útil para confirmar baixas contagens de plaquetas após uma suspeita de erro pelo equipamento automatizado ou quando não se tem esse aparelho disponível para uso.

**Unitermos:** contagem de plaquetas; plaquetas; estatísticas não paramétricas; correlação de dados; azul de metileno.

### ABSTRACT

**Introduction:** Automated hematology analyzers are able to produce low platelet counts with great precision and accuracy. However, these analyzers may produce erroneous counts due to the presence of interferences. Therefore, additional methodologies are required to confirm platelet counts, such as blood smear and a direct count, using the Neubauer chamber. **Objective:** To validate the reliability estimate produced by the G&S method. **Material and method:** One hundred and fifty platelet counts were analyzed in the hematology and emergency laboratories of the Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé, in Lima, Peru, by four methodologies: one optical platelet count (PLTO), one indirect blood smear count (Indirect), and two direct counts (Direct and G&S). Descriptive and inferential statistics were used to compare the groups. **Results:** A significant difference was observed in the distribution of the four methodologies and, after applying the post-hoc analysis, a similarity between the PLTO and G&S methods was found. Also, the Direct, G&S and Indirect methods showed a positive correlation with the PLTO method. The Bland-Altman test demonstrated that the G&S method presented a high agreement with the PLTO method. **Conclusion:** The G&S method is inexpensive, easy to perform, and has demonstrated statistical reliability concerning the automated methodology, and is useful for confirming low platelet counts after a suspected error by the automated equipment or when this device is not available for use.

**Key words:** platelet count; platelets; nonparametric statistics; data correlation; methylene blue.

## RESUMEN

**Introducción:** Los analizadores automáticos hematológicos son capaces de realizar bajos recuentos de plaquetas con precisión y exactitud. Sin embargo, eses analizadores pueden producir recuentos erróneos debido a la presencia de interferencias. Así, métodos adicionales son necesarios para confirmar los recuentos de plaquetas, como el frotis de sangre y un recuento directo en cámara de Neubauer. **Objetivo:** Validar la confiabilidad de la estimación del método G&S. **Material y método:** Se analizaron ciento cincuenta recuentos de plaquetas en los laboratorios de hematología y emergencias del Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé, en Lima, Perú, por cuatro métodos: un recuento óptico de plaquetas (PLTO), un recuento indirecto por frotis de sangre (Indirecto) y dos recuentos directos (Directo y G&S). Se utilizaron estadísticas descriptivas e inferenciales para comparar los grupos. **Resultados:** Se observó diferencia significativa en la distribución de los cuatro métodos y, luego de la aplicación del análisis post-hoc, se encontró similitud entre los métodos PLTO y G&S. Además, los métodos Directo, G&S e Indirecto mostraron correlación positiva con el método PLTO. La prueba de Bland-Altman demostró que el método G&S presentó alta concordancia con el método PLTO. **Conclusión:** El método G&S es económico, fácil de llevar a cabo y demostró confiabilidad estadística en relación con el método automatizado, siendo útil para confirmar bajos recuentos de plaquetas después de una sospecha de error por el equipo automático o cuando el laboratorio no cuente con éste.

**Palabras clave:** recuento de plaquetas; plaquetas; estadísticas no paramétricas; correlación de datos; azul de metileno.

## INTRODUÇÃO

Os laboratórios de hematologia precisam confirmar baixas contagens de plaquetas para apoiar ou ajudar alguns procedimentos médicos ou diagnósticos de distúrbios que envolvem esses fragmentos celulares, como doação de sangue, cirurgias, doenças genéticas relacionadas com a trombocitopenia, entre outros. Ao longo da história, vários métodos de contagem de plaquetas foram descritos<sup>(1-3)</sup>. O método imunológico de contagem de plaquetas (método de referência) não é utilizado rotineiramente devido ao alto custo de anticorpos monoclonais e da citometria de fluxo; assim, a maioria dos laboratórios utiliza analisadores de hematologia selecionados em impedância ou metodologia óptica para confirmar amostras trombocitopênicas de sangue.

Entre os métodos de contagem indireta (sangue periférico), o método da relação hemácias/plaquetas<sup>(4)</sup> demonstrou estar bem correlacionado com a metodologia automatizada. No entanto, não há, no Peru, um método indireto padronizado para ser utilizado. Consequentemente, os relatórios podem apresentar fraca concordância, como demonstrado por Conde e Rodríguez (2018)<sup>(5)</sup>.

Por outro lado, entre os métodos de contagem direta (câmara de Neubauer), o método Brecher e Cronkite é recomendado pelo Conselho Internacional de Normalização em Hematologia [International Council for Standardization in Haematology (ICSH)] e pela Sociedade Internacional de Hematologia Laboratorial [International Society for Laboratory Hematology (ISLH)] para amostras trombocitopênicas de sangue<sup>(6)</sup>, embora seja necessário um microscópio de contraste de fase para a contagem de plaquetas,

pois é difícil reconhecê-las pelo microscópio de campo claro (elas apresentam completa ausência de cor). Além disso, é proposto um novo método direto: o método G&S, que visa à contagem de plaquetas para amostras de sangue trombocitopênicas, a fim de confirmar o resultado de uma baixa contagem de plaquetas fornecida por equipamento automatizado, ou quando este não estiver disponível e um microscópio de campo claro for utilizado, no qual as plaquetas possam ser reconhecidas fácil e rapidamente pela cor (azul) e refringência. Reagentes baratos também são utilizados, pois são de fácil aquisição pelos laboratórios e possuem uma implementação muito básica para a realização de testes hematológicos importantes, como hemograma (HC). O Peru, por exemplo, tem 2296 pequenos centros de saúde que não possuem analisadores automáticos de hematologia, de acordo com o último decreto do Ministro da Saúde do Peru (MINSa)<sup>(7)</sup>.

Portanto, esta pesquisa teve como objetivo validar a confiabilidade gerada pela estimativa da contagem de plaquetas em amostras de sangue trombocitopênicas utilizando o método G&S; por esse motivo, foi comparada com outras formas padronizadas de contagem para demonstrar que é um método útil para confirmar contagens de plaquetas baixas.

## MATERIAL E MÉTODO

Pesquisa científica realizada nos laboratórios de hematologia e emergência do Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé, a qual apresentou as seguintes características.

## Metodologia

Pesquisa quantitativa, descritiva e transversal.

## Amostragem

A amostragem foi composta por todas as amostras de sangue encaminhadas aos laboratórios descritos; 150 amostras foram escolhidas. Todas eram amostras de sangue trombocitopênicas apenas, selecionadas por uma amostragem de conveniência não probabilística. Os critérios de inclusão foram: amostras de sangue venoso extraídas com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) dipotássico ou tripotássico com menos de 4 horas de armazenamento à temperatura ambiente e amostras de sangue venoso colhidas em pacientes do Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé durante o mês de julho de 2018. Os critérios de exclusão foram: presença de coágulos, amostras de sangue venoso lipêmico, icterico ou hemolisado e volume inadequado.

## Coleta de dados

Previamente, foi solicitado um pedido de participação a dois médicos tecnólogos (MT) que realizaram as contagens. Em seguida, as folhas de coleta de dados e de procedimentos operacionais padronizados criadas para o método G&S foram fornecidas. Esfregaços de sangue (Indireto) para contagem indireta de plaquetas foram realizados; o analisador automático e os métodos Brecher e Cronkite (Direto) e G&S também foram utilizados. Os resultados foram tabulados no programa Microsoft Excel 2010.

Para obter apenas o coeficiente de variação interobservadores, os dois avaliadores realizaram contagens usando o método G&S, em paralelo, para as últimas 20 amostras.

## Procedimentos

### *Contagem óptica de plaquetas: PLTO*

O equipamento automatizado de hematologia utilizado foi o Abbott CELL-DYN Ruby. Sua metodologia baseia-se na dispersão da luz em duas dimensões (contagem óptica bidimensional).

### *Contagem direta: método Brecher e Cronkite*

Este método utiliza um líquido diluente composto por oxalato de amônio e água destilada; seus efeitos causam plasmólise de hemácias e degeneração nuclear de leucócitos, além de impedir a agregação plaquetária e sua adesão a outros elementos<sup>(8,9)</sup>. Nesta pesquisa, nomeia-se apenas Direto para diferenciar de outros métodos alternativos criados a partir dele<sup>(10-11)</sup>.

Essa contagem foi realizada seguindo as sugestões descritas nos artigos The reproducibility and constancy of the platelet count<sup>(12)</sup> e Morphology and enumeration of human blood platelets<sup>(13)</sup>.

### *Método G&S: aplicação do azul de metileno HAMA*

Esse novo método de contagem direta proposto pelo principal autor desta pesquisa foi padronizado apenas para amostras trombocitopênicas, com o objetivo de confirmar o relatório do equipamento automatizado. Ele utiliza oxalato de amônio, que lisa as hemácias, e o azul de metileno, que é oxidado pelo bicarbonato de sódio por ebulição. Essa última ação produz azures (derivados com um número menor de grupos metil) que criam uma melhor atração eletrostática com as moléculas de glicosaminoglicano ácido (ácido siálico) encontradas na membrana plaquetária<sup>(14)</sup>. No final, as plaquetas podem ser reconhecidas na câmara de Neubauer, não apenas por sua refringência e morfologia, mas, também, pela cor.

Essa nova maneira de preparar o corante, também proposta pelo principal autor desta pesquisa, chamado azul de metileno HAMA, foi preparada da seguinte maneira: diluir 1 g de azul de metileno em 100 ml de água destilada, adicionar 1 g de bicarbonato de sódio e misturá-los. Depois, ferver a solução (100°C); uma vez alcançada, tempo de 20 minutos. Por fim, conservar a solução em temperatura ambiente, após filtrar com papel Whatman 2°. Uma vez congelada, a solução está pronta para uso e sua estabilidade é indefinida, como a maioria dos corantes (a preparação para este estudo foi realizada em 2016, sem qualquer variação na qualidade ou contaminação por microrganismos).

### *Procedimento*

- Para cada 20 µl de sangue, dilua com 425 µl de oxalato de amônio a 1% em tubos de plástico de 12 × 75 mm (não utilizar vidro porque as plaquetas podem aderir às paredes do tubo). Continue misturando por 20 segundos (lentamente) e aguarde 18 minutos de incubação à temperatura ambiente; limpe o excesso de sangue na superfície da ponta com um pedaço de papel toalha antes de misturar.
- Em seguida, adicione 15 µl do azul de metileno HAMA e misture cinco vezes. Distribua imediatamente 20 µl da solução total em apenas um lado da câmara Neubauer. Deixe repousar em uma placa de Petri com um pedaço de algodão molhado por 2 minutos para que ocorra a sedimentação de plaquetas.
- Finalmente, a contagem de plaquetas é realizada por um microscópio de campo claro, com objetiva de 40×, o condensador totalmente abaixado, o diafragma quase completamente fechado na área de contagem de hemácias (quadrante secundário central), exceto o quadrante terciário central (apenas quatro quadrantes, superior esquerdo e direito; inferior direito e esquerdo). As plaquetas podem ser diferenciadas de outros elementos devido

a sua intensa cor azul, refringência e formato redondo ou oval. O número total de plaquetas contadas foi multiplicado por 1437, resultando no número de plaquetas/ $\mu\text{l}$  de sangue.

### Contagem indireta de plaquetas

Nesta pesquisa, a contagem indireta de plaquetas aparece como Indireta e foi realizada com base nas sugestões descritas no artigo Estimation of the platelet count basis on red blood cells/platelet ratio<sup>(4)</sup>.

### Análise estatística

Após o período de coleta, os dados foram processados e analisados nos programas Microsoft Excel 2010, SPSS 15.0, GraphPad Prism<sup>®</sup>, e as análises estatísticas descritivas e inferenciais foram realizadas. Entre elas, destacam-se: estabelecimento de intervalos de contagem, média aritmética, desvio padrão (DP) e cálculo da variação do coeficiente interobservador. Também foram calculados os testes de normalidade e de Friedman, seguidos pelo teste *post-hoc* de Dunn para comparar os grupos. Finalmente, o coeficiente de correlação de Spearman, a análise residual e o teste de Bland-Altman foram aplicados. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

### Aspectos éticos

Esta pesquisa foi aprovada pelo chefe do serviço de patologia clínica e pelo Comitê de Ética do Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé.

## RESULTADOS

### Morfologia, refringência e coloração plaquetária pelo método G&S

Em todas as observações, as plaquetas eram redondas ou ovais, azuis (**Figura 1**) e refratárias (**Figura 2**), e o valor numérico foi comparado com o de outros métodos de contagem. Durante a visualização, alguns leucócitos e hemácias também foram observados, os quais foram diferenciados por sua morfologia, pouca ou nenhuma refringência e coloração.

### Estabelecimento de intervalos de contagem e cálculo da média aritmética $\pm$ DP

Os intervalos de contagem foram ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ ): 41-130; 37-118; 43-135; e 55-145 plaquetas para os métodos PLTO, Direto, G&S e Indireto, respectivamente. As médias aritméticas  $\pm$  DP foram ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ ):  $83,47 \pm 6,86$ ;  $74,81 \pm 5,42$ ;  $85,45 \pm 7,2$ ; e  $97,3 \pm 8,75$  plaquetas para os métodos PLTO, Direto, G&S e Indireto, respectivamente.

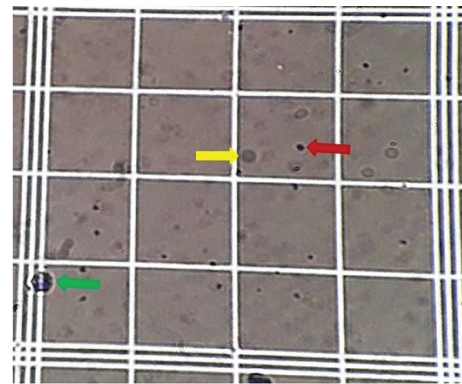


FIGURA 1 – Coloração plaquetária exibida em 40 $\times$  de acordo com o método G&S  
Seta verde: leucócito; seta amarela: eritrócito; seta vermelha: plaquetas.

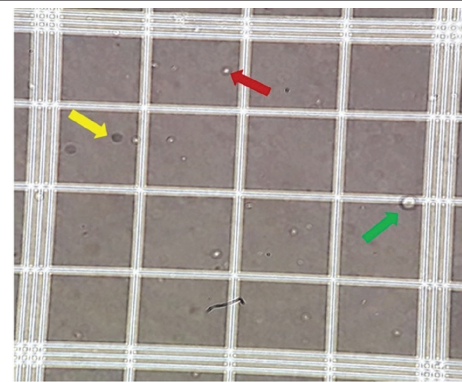


FIGURA 2 – Refringência plaquetária exibida em 40 $\times$  de acordo com o método G&S  
Seta verde: leucócito; seta amarela: eritrócito; seta vermelha: plaquetas.

### Determinação do coeficiente de variação interobservador para o método G&S

O intervalo final ficou entre 7,5% e 8,4%.

### Aplicação do teste de normalidade ou contraste de normalidade

O teste de normalidade foi utilizado para verificar se a hipótese de normalidade está correta, de modo que certas análises apresentem confiabilidade estatística, como para a análise de variâncias (Anova) ou o teste *post-hoc* de Dunn. O teste de Kolmogorov-Smirnov, que rejeitou a hipótese de normalidade ( $p < 0,05$ ), foi utilizado para os métodos de contagem de PLTO, Direto e G&S.

### Aplicação de estatísticas não paramétricas

Como os valores relatados rejeitaram a hipótese de normalidade, testes não paramétricos foram realizados para determinar se há diferenças significativas entre todos os métodos de contagem de plaquetas. O teste de Friedman mostrou que existem evidências

suficientes para rejeitar a hipótese nula ( $p < 0,05$ ) e concluir que existem diferenças significativas ( $> 7,81$  para quatro grupos) entre os quatro métodos; seu valor neste estudo foi de 152,6.

Posteriormente, procedeu-se à identificação de qual grupo ou grupos especificamente são significativos em relação aos demais; em seguida, o teste de comparação múltipla de Dunn foi realizado, mostrando que não há diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) somente entre os métodos G&S e PLTO. Para melhorar essa interpretação, foram desenvolvidos diagrama de caixa e quartis (Figura 3).

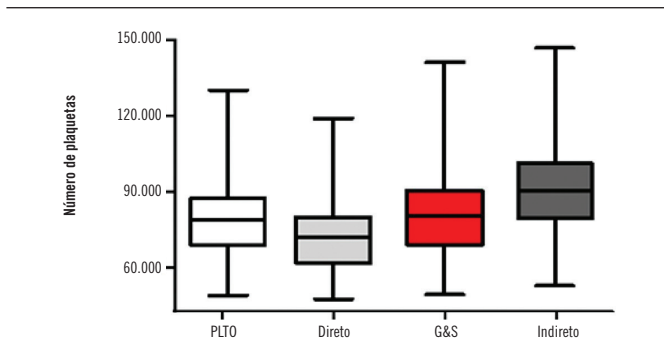


FIGURA 3 – Diagrama de caixa de todos os métodos realizados. Os métodos PLTO e G&S apresentaram distribuição semelhante.

### Coefficiente de correlação de Spearman

Essa estatística mostrou uma correlação positiva entre os métodos Direto, G&S e Indireto (0,987, 0,998 e 0,981, respectivamente) em relação ao método automatizado (PLTO).

### Análise de resíduos

Os valores residuais foram plotados e o melhor resultado foi fornecido pelo método G&S (Figura 4), cujos valores apresentaram menor distância da média (0).

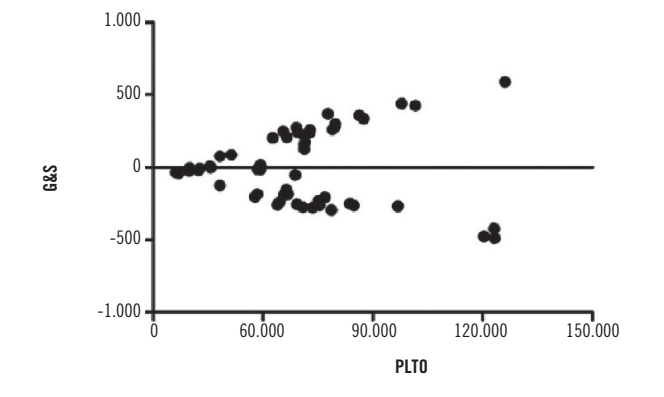


FIGURA 4 – Resíduos do método G&S em relação ao PLTO. Os valores estavam próximos da linha 0 de acurácia.

### Teste de Bland-Altman

Os métodos Direto, G&S e Indireto (Figuras 5, 6 e 7, respectivamente) mostraram que a maioria das diferenças está localizada em torno do viés (4245,7 plaquetas/ $\mu$ l, 27,8421 plaquetas/ $\mu$ l e -28984,4 plaquetas/ $\mu$ l, respectivamente).

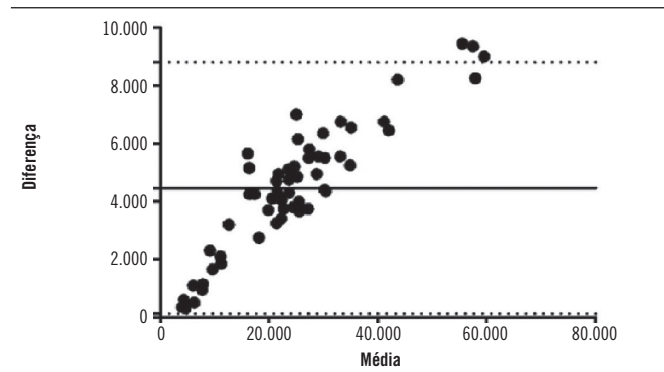


FIGURA 5 – Teste de Bland-Altman para o método Direto. Os resultados ficaram acima da 0 linha de concordância.

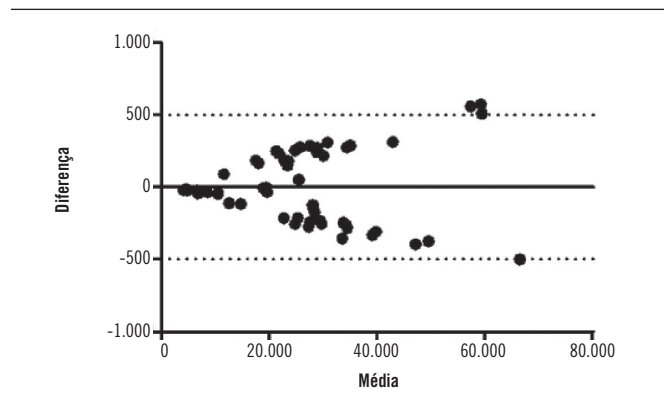


FIGURA 6 – Teste de Bland-Altman para o método G&S. Os resultados ficaram em torno da linha 0 de concordância.

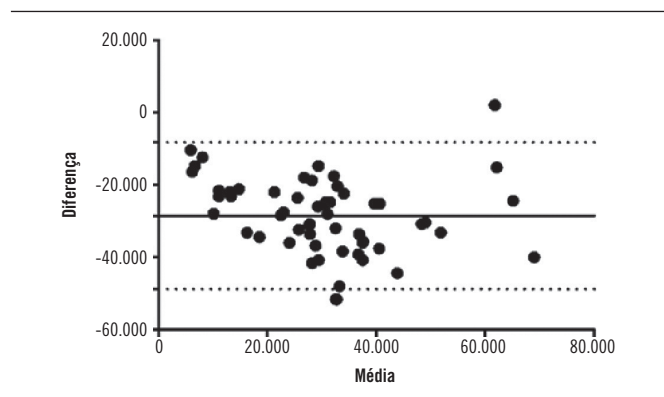


FIGURA 7 – Teste de Bland-Altman para o método Indireto. Os resultados ficaram abaixo da linha 0 de concordância.

## DISCUSSÃO

O método automatizado (contagem óptica de plaquetas) foi tomado como referência neste estudo devido à confiabilidade gerada por essa metodologia, que também foi utilizada como referência em outros trabalhos<sup>(15, 16)</sup>. No entanto, esses princípios têm limitações: a correlação diminui na presença de interferentes, como fragmentação de eritrócitos ou leucócitos, lipídios, crioglobulinas, entre outros; isso foi demonstrado por Congona (2011)<sup>(17)</sup>. Portanto, o laboratório de hematologia necessita de outras metodologias para confirmar essas contagens baixas.

O método que apresentou maior dispersão dos dados em relação à sua média foi o Indireto, uma vez que mostrou menor precisão em relação aos demais. Uma diminuição no coeficiente de variabilidade interobservadores foi observada em relação aos resultados relatados em outros estudos<sup>(18, 19)</sup>, nos quais a quantidade de 20 amostras para o seu cálculo também foi utilizada em outras pesquisas<sup>(20, 21)</sup>. Isso demonstrou que o método G&S melhora o reconhecimento das plaquetas pelos observadores, porque agora a cor também pode ser considerada.

Além disso, os resíduos gerados por esse método (G&S) também apresentaram menor distância da média (0), o que significa que possui o maior grau de precisão. O fato de o método G&S apresentar o menor viés (teste de Bland-Altman) não gerou admiração devido à facilidade de reconhecimento de plaquetas e à quantidade correta de amostragem escolhida (tamanhos semelhantes já foram considerados em estudos similares)<sup>(15, 16)</sup>.

Na Figura 5, as diferenças entre as medidas estão acima de 0, o que significa que as contagens de plaquetas pelo método Direto são menores que no método PLTO (referência neste estudo). Na Figura 7, as diferenças entre as medidas estão abaixo de 0; isso demonstra que as contagens de plaquetas que utilizam o método Indireto tendem a superestimar as contagens. Por outro lado, a Figura 6 mostra que a diferença teve um valor próximo de 0 e estava dentro dos limites de concordância, mostrando que os métodos G&S e PLTO produziram resultados muito semelhantes.

Devido a essa superestimação gerada pela metodologia óptica ou de impedância, os métodos de contagem indireta não são recomendados para contagens de plaquetas baixas. Essa orientação também foi relatada em outros estudos<sup>(22, 23)</sup>, como o guia fornecido pelo Instituto de Saúde Pública do Chile:

recomendaciones para la interpretación del hemograma: serie roja, blanca y plaquetaria<sup>(24)</sup>. Uma limitação produzida pelo método G&S é a geração de resultados em 20 minutos, no entanto, considerando que apenas um lado da câmara de Neubauer é utilizado para o procedimento, dois resultados (dois pacientes) podem ser obtidos nesse período. Ademais, o tempo de preparação do corante HAMA azul de metileno (20 minutos) é considerado negligenciável, porque se apenas 100 ml forem preparados, mais de 6600 testes (15 µl por teste) poderão ser realizados.

Portanto, existem estudos que destacam o valor de contagem direta de plaquetas baixa (câmara de Neubauer) para laboratórios de hematologia, como os realizados por Anilema (2016)<sup>(25)</sup> e Zabala (2013)<sup>(26)</sup>; e mesmo em procedimentos realizados por Leena (2014)<sup>(15)</sup> para laboratórios de bancos de sangue (plasma pobre em plaquetas). Além disso, existem manuais que também recomendam métodos de contagem direta, como o realizado por Kitchen S *et al.* (2010)<sup>(27)</sup>, cujo título é Diagnóstico de hemofilia y otros trastornos de la coagulación, e o manual atual de procedimentos laboratoriais em técnicas básicas de hematología do Instituto Nacional de Saúde do Peru (2005)<sup>(28)</sup>.

## CONCLUSÃO

O método G&S é barato, fácil de executar e demonstrou confiabilidade estatística em relação à metodologia automatizada, sendo útil para confirmar contagens de plaquetas baixas após suspeita de erro do equipamento automatizado ou quando o laboratório não o tiver. Estudos adicionais são recomendados, nos quais apenas amostras patológicas serão consideradas, ou cada interferente será analisado independentemente.

## AGRADECIMENTOS

Augusto Adán Marimón Pacheco e Fredy Barboza León pelo apoio na contagem de plaquetas.

Carlos Orlando Velasquez Figueroa e Diego Arturo Paniagua Napán pelos conselhos prestados sobre automação em hematología; empresa BIOSIX IMPORT S.A.C. pela doação de oxalato de amônio a 1%.

## REFERÊNCIAS

1. Fink N. Automatización en hematología. *Hematología*. Enero-Abril. 2005; 9(1): 2-11.

2. Campuzano G. Del hemograma manual al hemograma de cuarta generación. *Medicina & Laboratorio*. 2007; 13: 11-12.

3. Hernández L. Avances y aplicación clínica de la citometría hemática automatizada. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*. 2013; 29(1): 24-39.

4. Brahimi M, Osmani S, Arabi A, et al. Estimation of platelet count on the basis of red cell: platelet ratio. *Iraqi Journal of medical sciences*. 2009; 26(1): 21-4.
5. Conde S, Rodríguez R. 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. [tese]. Perú: Universidad Norbert Wiener, Facultad de Ciencias de la Salud; 2018.
6. Harrison P, Kenneth A, Chapman S, et al. An interlaboratory study of a candidate reference method for platelet counting. *Am J Clin Pathol*. 2001; 115: 448-59.
7. Superintendencia Nacional de Salud. Intendencia de Investigación y Desarrollo. Infraestructura del sector salud por tipo de establecimiento, según departamento, 2016 (número de establecimientos). Lima: Compendio Estadístico Peru; 2017.
8. Lynch M, Raphael S, Mellor L, Spare P, Inwood M. Obtención de muestras de sangre y citometría hemática. In: Folch R, editor. *Métodos de laboratorio*. México: Nueva Editorial Interamericana; 1972. p. 713.
9. Lewis S, Bain B, Bates I. Hematología en laboratorios de recursos escasos. In: Elsevier España, editor. *Dacie y Lewis hematología práctica*. España: Elsevier; 2008. p. 580-1.
10. Rodak B. Pruebas de rutina en hematología. En: Giovaniello O, Oxemberg J, Rondinone S, Taveira J, editors. *Hematología fundamentos y aplicaciones clínicas*. Argentina: Médica Panamericana; 2004. p. 159-60.
11. Crocker J, Burnett D. Análisis de plaquetas. In: Tovar M, editor. *La ciencia del diagnóstico de laboratorio*. México: McGraw-Hill-Interamericana; 2007. p. 290.
12. Brecher G, Cronkite E. Morphology and enumeration of human blood platelets. *J Appl Physiol*. 1950; 3: 365-77.
13. Brecher G, Cronkite E, Schneiderman M. The reproducibility and constancy of the platelet count. *Am J Clin Pathol*. 1953; 23: 15-26.
14. Lillie R. Quinone-iminedyes. In: Lillie R, Stotz E, Emmel V, Darrow M, editores. *H. J. conn's biological stains*. United States: The Williams & Wilkins Company; 1969. p. 430.
15. Leena J, Devaraju S, Saldhana C. A comparative study of Platelet counts by manual and automathed methods in platelet poor plasma. *Int J Rec Rec Trends Sci Technol*. 2014; 12(2): 262-5.
16. Pan L, Chen Ch, Huang W, Sun Ch. Enhanced accuracy of optical platelet counts in microcytic anemia. *Lab Medicine*. 2014; 45(1): 32-6.
17. 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. [tese]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina; 2011.
18. Banfi G, Salvagno GL, Lippi G. The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. *Clin Chem Lab Med*. 2007; 45(5): 565-76.
19. Brambila E, Castillo R, Lozano P. Comparación entre tres métodos manuales empleados en la cuenta diferencial de leucocitos respecto a un equipo automatizado. *Bioquímica*. 2003; 28(3): 4-12.
20. García F. Evaluación de la calidad de vida y remodelado cardíaco en pacientes sometidos a ablación de flúter auricular dependiente del istmo cavo-tricuspídeo. [tese]. España: Universidad de Santiago de Compostela Facultad de Medicina; 2009.
21. Hernández S, Fernández C, Baptista L. Selección de muestra. In: Rocha M, editor. *Metodología de la investigación*. México: McGraw-Hill/Interamericana; 2014. p. 177.
22. Rachid M, Al-Farsi R, Al-Hashmi S, Al-Riyami H, Khan H, Al-kindi S. Comparative analysis of four methods for enumeration of platelet counts in thrombocytopenic patients. *J Appl Hematol*. 2015; 6(3): 119-24.
23. Gómez S. Comparación del método de fluorescencia, impedancia y microscopía óptica en el recuento de plaquetas en distintos grupos de pacientes. Conferencia Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia. In: Sesión laboratorio básico y automatización en hematología. España; 2017.
24. Retamales E. Recomendaciones del informe del frotis sanguíneo serie plaquetaria. In: Moscoso H, Ramírez V, editores. *Recomendaciones para la interpretación del hemograma: serie roja, blanca y plaquetaria*. Chile: Comité Editor Instituto de Salud Pública; 2015. p. 20-2.
25. Anilema M, Baños G. Importancia de las determinaciones de proteinuria de 24 horas y contaje de plaquetas como ayuda diagnóstica de preeclampsia en mujeres embarazadas que acuden al hospital Gineco Obstétrico Isidro Ayora en la ciudad de Quito durante el período octubre 2015-marzo 2016. [tese]. Quito: Universidad Nacional de Chimborazo, Facultad de Ciencias de la Salud; 2016.
26. Zabala N, Hannaqui E. Comparación del contaje plaquetario empleando diferentes metodologías, en pacientes con purpura trombocitopénica y síndromes mielodisplásicos. *Saber*. 2013; 25(3): 259-64.
27. Kitchen S, McCraw A, Echenagucia M. Platelet count. In: Ahmed M, Lam C, de Bosch N, et al., editors. *Diagnosis of hemophilia and other bleeding disorders*. Canada: World Federation of Hemophilia; 2010. p. 30-4.
28. Muñoz M, Morón C. Recuento de reticulocitos y plaquetas. In: Cabezas C, Cabrera R, editores. *Manual de procedimientos de laboratorio en técnicas básicas de hematología*. Perú: Comité Editor Instituto Nacional de Salud; 2005. p. 60-2.

#### AUTOR CORRESPONDENTE

Gian Carlos Ramirez-Ubillus  0000-0002-9236-8667  
e-mail: scarlos1@hotmail.com



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.