

**UTILITAT DE LES NOVES TECNOLOGIES AL LABORATORI
D'HEMATOLOGIA: DIAGNÒSTIC INTEGRAT A LA
PATOLOGIA**

Joan Casadesús Serrando



Tutora: Montse Miralles

2n de Batxillerat Escola Maristes Girona

Curs: 2019/20

RESUM

El meu treball de recerca es basa fonamentalment en l'ús de les noves tecnologies al laboratori clínic per arribar a fer diagnòstics de diferents malalties. Amb els analitzadors que es troben als laboratoris clínics actualment es poden fer molts algorismes i processos per poder arribar més ràpid i amb més confiança al diagnòstic d'una malaltia.

La limfocitosi o excés de limfòcits a la sang és una condició patològica molt habitual en la població. Cal saber si aquesta alteració es troba relacionada amb una malaltia maligna de la sang o bé és una infecció vírica. Combinant diferents metodologies he pogut saber i fer tots els passos que són necessaris per arribar a aquest diagnòstic.

L'edat dels pacients, els resultats de l'hemograma i les proves addicionals que es fan al laboratori són imprescindibles per poder assegurar quin tipus de malaltia pateix el pacient. És molt important que es segueixin tots els passos de forma endreçada, fixar-se molt bé en tots els resultats i interpretar correctament totes les dades que es tenen d'una mostra d'algú que no es troba bé. Com en tots els camps de la medicina, no es troben malalties sinó que es veuen malalts.

ABSTRACT

The main goal of my research study is to know how new technologies can improve the process of diagnosis in clinical laboratories. Nowadays new analysers provide physicians with advanced software which can work with algorithms in order to obtain accurate results and early diagnosis.

Defined as a higher number of cells in peripheral blood than usual, lymphocytosis is a common pathological condition. We have to know if this alteration is related to a viral infection or a neoplastic disease. In the laboratory the most important thing is to follow all the steps needed as well as a correct interpretation of the results when we have someone that presents a bad clinical condition.

It has to be said that when we are working in this field, medicine, we are talking about people with a disease, not only diseases.

ÍNDEX

1.	INTRODUCCIÓ	3
1.1.	JUSTIFICACIÓ DEL TREBALL	3
1.2.	EVOLUCIÓ HISTÒRICA DE L'HEMOGRAMA AL LABORATORI; SITUACIÓ ACTUAL DEL LABORATORI D'HEMATOLOGIA.	4
1.2.1.	NOVES TECNOLOGIES APLICADES AL LABORATORI	6
1.2.2.	DIAGNÒSTIC INTEGRAT EN ALGORITMES.....	7
1.2.3.	DETECCIÓ DE PATOLOGIA BENIGNA I MALIGNA.....	8
1.3.	MARC TEÒRIC.....	11
1.3.1.	FISIOLOGÍA DE LA HEMATOPOIESIS I FACTORS DE CREIXEMENT HEMATOPOIÈTICS.....	11
1.3.2.	PRINCIPALS PARÀMETRES SANGUÍNIS EN HEMATOLOGÍA CLÍNICA. INTERPRETACIÓ DE LA HEMATIMETRÍA.....	17
1.3.3.	EXAMEN MORFOLÒGIC DE LA SANG PERIFÉRICA	23
1.3.4.	FONAMENT BÀSIC DE LES PRINCIPALS TECNOLOGIES AL LABORATORI D'HEMATIMETRIA.....	29
1.3.4.1.	IMPEDÀNCIA.....	30
1.3.4.2.	CITROMETRIA DE FLUX	31
1.3.4.3.	TECNOLOGIA VCS I AIM " <i>automated intelligent morphology</i> "	35
1.3.5.	DESCRIPCIÓ DE LES PATOLOGIES INCLOSES EN EL TREBALL	38
1.3.5.1.	LIMFOCITOSI REACTIVA.....	38
1.3.5.2.	MONONUCLEOSI INFECCIOSA.....	39
1.3.5.3.	LEUCÈMIA LIMFÀTICA CRÒNICA	40
1.4	CONCEPTES ESTADÍSTICS	42
2.	METODOLOGIA (MATERIAL I MÈTODE)	46
2.1.	RECEPCIÓ I PROCESSAMENT DE LES MOSTRES.	46
2.2.	TIPUS DE MOSTRA AL LABORATORI	48
2.3.	PROCESSAMENT DE LES MOSTRES A HEMATOLOGIA	49
2.3.1	HEMOGRAMA	50
2.3.2.	CITOLOGIA	52
2.3.3	CITOMETRIA DE FLUX ESPECÍFICA	54
2.4	PAQUET ESTADÍSTIC	59
3.	MARC PRÀCTIC.....	61
3.1	RESUM DE L'ESTUDI FET AL MARC PRÀCTIC	61

3.2 PART PRÀCTICA	62
3.2.1. LA LIMFOCITOSI AL LABORATORI. CRITERI DE REVISIÓ DEL PACIENT	62
3.2.2. PACIENTS INDIVIDUALS DE LES TRES CONDICIONS PATOLÒGIQUES ESTUDIADES.	69
3.2.3 ANÀLISIS ESTADÍSTIC D'UN NOU PARÀMETRE DE LA POBLACIÓ LIMFOCITÀRIA A L'HEMOGRAMA.....	79
4. DISCUSSIÓ I CONCLUSIONS	84
5. AGRAÏMENTS	90
6. BIBLIOGRAFIA I WEBGRAFIA	92

1. INTRODUCCIÓ

1.1. JUSTIFICACIÓ DEL TREBALL

El meu treball es basa fonamentalment en el diagnòstic de diferents malalties al laboratori. Les anàlisis clíniques constitueixen una branca de la medicina no massa coneguda entre la població general i inclús entre alguns metges i personal sanitari. La feina que es fa en un laboratori clínic és molt complexa i per molta gent sembla invisible ja que ningú es conscient del que realment es fa en aquest tipus de servei mèdic. És on es comença el diagnòstic de moltes malalties de diferents tipus.

Per motius familiars conec bé aquest tipus de pràctica mèdica i a mi sempre m'ha cridat molt l'atenció ja que sóc una persona curiosa i m'agrada la dinàmica de treball que tenen tots els professionals del servei.

Al ser conscient realment del que fan en un laboratori, parlant amb alguns treballadors del laboratori, em van explicar que a través de una sola prova es podien diagnosticar des d'un càncer fins a una infecció vírica entre moltes altres malalties, i vaig tenir la necessitat de saber quin era el següent pas i quins passos s'han de seguir per poder determinar finalment per quin camí anava la anomalia del pacient.

Em vaig decidir més per la branca del diagnòstic ja que vaig veure que la tecnologia actual avançava ràpidament i vaig veure millor opció entrar en aquest món per seguir amb precisió tots els moviments que es fan dins el laboratori i per veure com realment es diagnostiquen aquests tipus de malalties amb detall.

Vaig sol·licitar una estada formativa per estudiants de batxillerat al laboratori pel meu interès personal per les ciències biosanitàries; el fet de tenir l'oportunitat de fer diagnòstics amb les meves pròpies mans em va motivar per tirar la idea endavant i em va servir molt per enfocar el meu treball de recerca.

Els objectius que m'agradaria dur a terme un cop comenci la meva experiència al laboratori son:

- Saber tot el que pugui de les malalties que es diagnostiquen al laboratori i ser conscient del que passa dins del organisme del pacient en cada cas

- Veure quin es el procés que duen a terme tots els professionals del laboratori per arribar al diagnòstic final
- Quins procediments fan servir al laboratori per poder dur a terme el diagnòstic i quines màquines utilitzen durant el procés
- Com funcionen els autoanalitzadors i el procés al laboratori des de que la infermera punxa al pacient fins que es dona el diagnòstic final
- Centrar-me en la informació que obtenim del hemograma i què ens orienta per poder arribar a la conclusió final
- Saber quin es el ritme de treball de cada àrea del laboratori clínic i tenir clara la diferència entre tots ells i el que el seu treball comporta
- Quina repercussió té sobre el pacient el resultat diagnòstic que donem al laboratori
- Un cop tingui els coneixements necessaris, veure si jo mateix sóc capaç de seguir la malaltia de certs pacients i veure si puc fer jo el diagnòstic utilitzant les mateixes proves que fan servir els professionals.

1.2. EVOLUCIÓ HISTÒRICA DE L'HEMOGRAMA AL LABORATORI; SITUACIÓ ACTUAL DEL LABORATORI D'HEMATOLOGIA.

Fins l'any 1953 el recompte dels elements cel·lulars de la sang es feia de forma manual amb una càmera de vidre graduada, com veiem en la figura 1, on amb una quantitat coneguda de líquid (sang, líquids biològics, orina...) generalment de 1mm^3 es podia avaluar la quantitat de concentració de cèl·lules. Era un mètode molt poc precís amb molt marge de error i que consumia molt de temps.

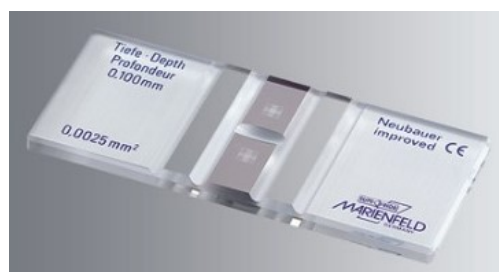


Figura 1: càmera de Neuaber (reixeta amb zones d'anàlisi d' 1 mm^3) (Font: <http://equipamientocientifico.com/home/1465-camara-neubauer-con-espejo-de-vidrio-76mm-x-31mm.html>)

Aquest és l'exemple dels càlculs matemàtics que s'havien de fer per obtenir el resultat de la quantitat de leucòcits per un pacient com podem veure a la figura 2.

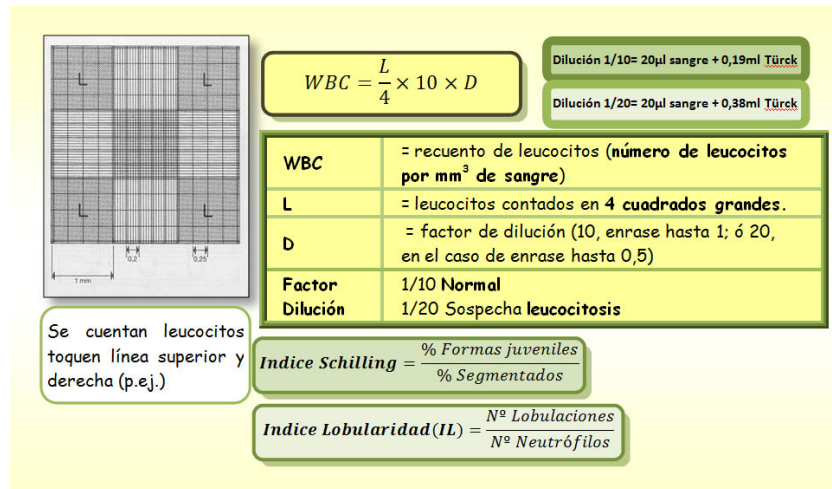


Figura 2: interpretació del recompte dels elements cel·lulars de la sang de forma manual amb càmera de Neubauer (Font: <http://soyroger.blogspot.com/2011/05/recuento-manual-de-leucocitos-en-camara.html>)

L'any 1947 l'investigador americà Wallace Coulter aplica la corrent elèctrica en una suspensió cel·lular de sang a través de un camp amb dos elèctrodes; descobreix que les cèl·lules deixen passar la corrent elèctrica provocant un pols elèctric al seu pas pel mig dels elèctrodes. Per tant aquest és el fonament de la impedància utilitzada per medis diagnòstics al laboratori clínic. Actualment es coneix com *principi Coulter*, i es troba a tots els analitzadors hematològics.

El primer analitzador hematològic veu la llum l'any 1953, imatge que veiem a la figura 3.

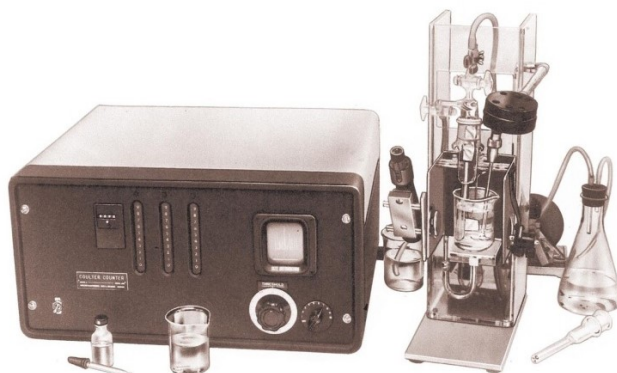


Figura 3: Primer analitzador Automàtic per fer Hemograma (Model Coulter A; Patent US N° 2656508 Means for counting particles suspended in a fluid, October 20, 1953, Wallace H. Coulter) (Font: https://es.wikipedia.org/wiki/Contador_Coulter)

Actualment els autoanalitzadors, com podem apreciar a l figura 4, son de quarta generació i tenen incorporats programes de gestió de les dades de tots els pacients analitzats permetent elaborar algoritmes diagnòstics i regles expertes segons els criteris diagnòstics actuals, per cada grup de patologies. A més es disposa de robòtica per fer treballar els analitzadors en cadena permetent processar mes de dos mil mostres en menys de dotze hores.



Figura 4: analitzadors de quarta generació, disponibles en cadena de forma robotitzada i amb programes de gestió de les dades.

1.2.1. NOVES TECNOLOGIES APLICADES AL LABORATORI

El principi Coulter segueix sent a dia d'avui la principal metodologia utilitzada pels aparells que trobem en els laboratoris d'Hematologia. S'han millorat molt amb noves tecnologies que ajuden a fer millor el diagnòstic. També cal dir que no només han millorat els aparells sinó que també disposem de moltes més eines informàtiques que permeten gestionar totes les dades que s'obtenen dels aparells.

Actualment hi ha al mercat 5 tipus diferents d'analitzadors hematològics, en funció de la casa comercial que els patentava i distribuïa. Tots disposen d'impedància per la mesura de la concentració dels tres elements cel·lulars de la sang (glòbuls vermells, glòbuls blancs i plaquetes). Per saber quin tipus de leucòcit té el pacient, alguns analitzadors utilitzen la Citometria de Flux (usant marcadors fluorescents), d'altres fan

servir una tècnica que es diu Citoquímica (marcar les cèl·lules amb substàncies químiques) i per últim alguns fan servir la radiofreqüència per fer aquest recompte.

Tots els analitzadors mesuren el mateix tipus de magnitud (valors de l'Hemograma) però utilitzant diferents metodologies per fer-ho. Una de les coses més importants en un laboratori és conèixer bé quin analitzador es fa servir per poder interpretar correctament els resultats que dona i saber què li passa al pacient.

1.2.2. DIAGNÒSTIC INTEGRAT EN ALGORIMTES

Gràcies a tota la informació que s'obté de l'hemograma i amb l'accés informàtic i compartit de les dades clíniques dels pacients, es poden elaborar algorimes per fer el diagnòstic dels diferents tipus de malaltia al laboratori clínic.

Per elaborar aquestes regles es tenen en comte les recomanacions internacionals de les diferents agrupacions professionals, en aquest cas les de Laboratori Hematologia i Clínic.

Si es combinen aquestes recomanacions amb l'experiència dels metges i professionals que se'n fan càrrec cada dia de revisar els resultats, la possibilitat de detectar correctament i de forma ràpida les malalties és molt alta i precisa.

Com a exemple, quan es troba una quantitat disminuïda d'hemoglobina a l'hemograma (molècula necessària per repartir oxigen als teixits) , la malaltia es diu anèmia. Amb la resta de dades de l'hemograma com el volum dels hematies podem saber si és per què falta ferro (anèmia ferropènica) o falta un altre tipus de vitamina (B12 o cobalamina); també pot ser anèmia en pacients amb alcoholisme crònic. Amb un algorime que inclou Hemoglobina i Volum dels eritròcits es pot fer aquest diagnòstic.

A la figura 5 podem veure un exemple d'algorime per fer el diagnòstic diferencial de les anèmies, validada per les diferents associacions científiques especialistes.

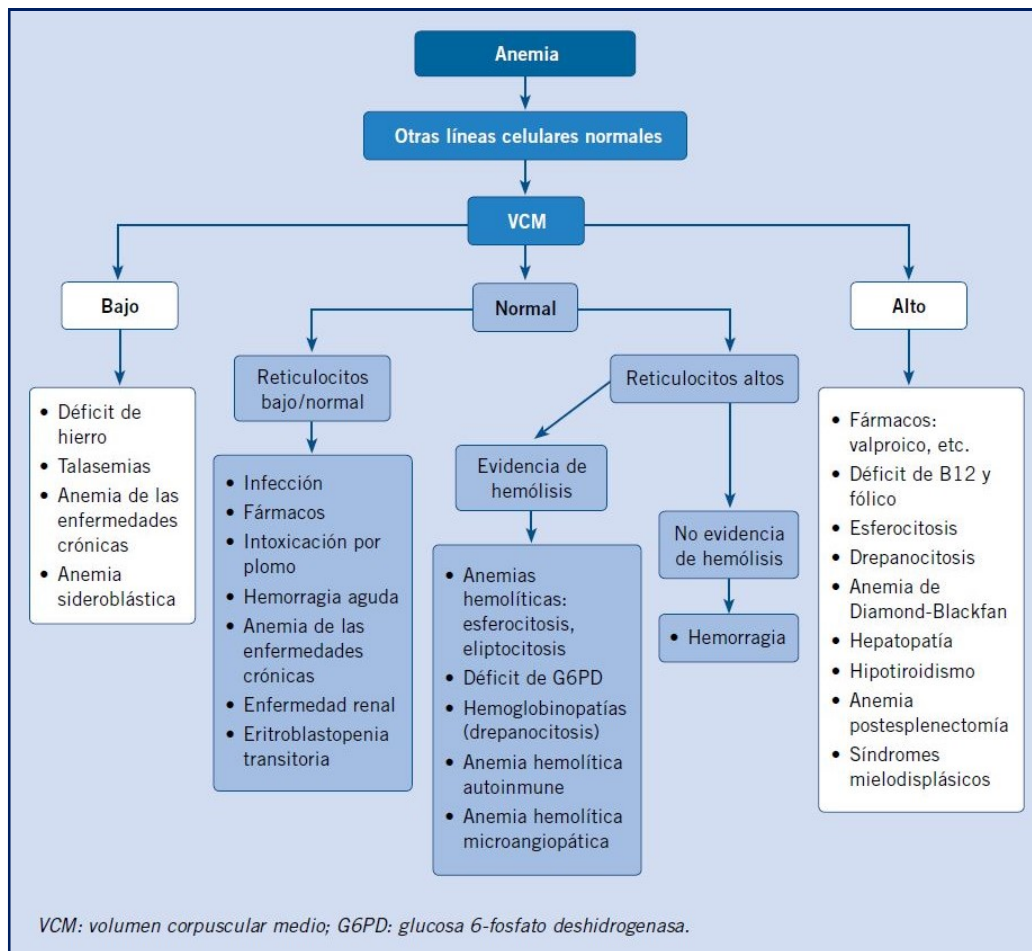


Figura 5; exemple algoritme per la detecció d'anèmia en funció del volum dels hematies o glòbuls vermells (Font: <https://www.pediatriaintegral.es/publicacion-2016-06/anemias-en-la-infancia-y-adolescencia-clasificacion-y-diagnostico-2016-06/>)

1.2.3. DETECCIÓ DE PATOLOGIA BENIGNA I MALIGNA

Una de les coses que és més urgent en el laboratori clínic d'hematologia és saber si el pacient que estem estudiant té una malaltia benigna o maligna.

Les malalties benignes no solen ser molt urgents (hi ha alguna excepció com una hemorràgia aguda o algun quadre infecció greu, per exemple); les malignes son malalties que solen ser neoplàsiques, és a dir, que son un càncer relacionat amb la sang.

El càncer de la sang o també anomenat Leucèmia es caracteritza per donar valors que no son normals a l'hemograma. Sovint cal fer un diagnòstic ràpid per poder avisar al pacient i posar el tractament quan més aviat millor.

En aquest tipus de malaltia també és important saber si son de tipus Agut (de presentació molt ràpida i cal fer tractament urgent) o crònica (de presentació més lenta però que cal tractar també).

MARC TEÒRIC

1.3. MARC TEÒRIC.

1.3.1. FISIOLOGIA DE LA HEMATOPOESI I FACTORS DE CREIXEMENT HEMATOPOÈTICS

L'hematopoesi és el procés de generació, regulació, producció i manteniment de cèl·lules de la sang perifèrica, que sorgeix a partir de una sola cèl·lula mare progenitora situada a la medul·la òssia. El seu funcionament normal surt de la interacció entre mecanismes intracel·lulars i la influència del microambient on es desenvolupen les cèl·lules hematopoètiques.

El sistema hematopoètic consta de diferents tipus cel·lulars: cèl·lules mare, cèl·lules progenitores i cèl·lules madures. Primerament, en les etapes embrionàries i fetals, aquest sistema es desenvolupa al intestí i a la melsa, i posteriorment a la medul·la òssia. Quan l'individu ja és adult, només es localitza a la medul·la òssia on les cèl·lules germinals es diferencien a cèl·lules més madures, i aquesta diferenciació està regulada per mecanismes complexos. Pel desenvolupament de les cèl·lules hematopoètiques son fonamentals alguns elements químics coneguts com factors de creixement.

La medul·la òssia cedeix les cèl·lules hematopoètiques més madures a la circulació on s'acaben de fer madures a l'arbre vascular i als diferents teixits, és necessari que es mantingui un equilibri entre la proliferació, diferenciació i l'apoptosi (mort programada de la cèl·lula quan detecta que ja no és funcional; també es coneix com *suïcidi cel·lular*) de les cèl·lules per mantenir-se entre les xifres considerades normals de les cèl·lules sanguínies.

ANATOMÍA CEL·LULAR DE LA HEMATOPOESI: aquest sistema està compost per diferents tipus cel·lulars organitzats jeràrquicament, és a dir, mentre es produeix el desenvolupament i maduració dels precursors, els elements madurs i els immadurs circulen per la sang perifèrica distribuïts per tots els òrgans i aparells, per tant, per tot el cos. L'inici del procés de diferenciació hematopoètic es dona a la medul·la òssia. Totes les línies cel·lulars provenen de una cèl·lula progenitora anomenada *cèl·lula mare o stem cell*, que donarà lloc als precursors de les tres sèries hematopoètiques: eritroide, granulocítica i megacariocítica.

A la figura 6 podem veure un esquema de l'hematopoesi que es dona lloc a la medul·la òssia alliberant les cèl·lules a la sang perifèrica.

Les cèl·lules mare hematopoètiques : les cèl·lules hematopoètiques son aquelles que tenen la màxima capacitat d'autorenovació, proliferació i diferenciació. Aquests aspectes es van perdent conforme la cèl·lula es diferencia en elements més madurs.

La majoria es troben a la medul·la òssia i un petit percentatge en la melsa o a la sang perifèrica. La cèl·lula mare comú dona lloc a la cèl·lula progenitora i la diferenciació cel·lular. Les cèl·lules progenitores es troben orientades cap a una de les línies hematopoètiques: granulomonocítica, limfoide, eritroide o megacariocítica.

- *Progenitors granulomonocítics:* inclouen unitats formadores de colònies granulocítiques (CFU-G), donant lloc a mieloblasts, promielòcits, mielòcits, metamielòcits i neutròfils; també donen lloc a unitats formadores de colònies monocítiques (CFU-M), que diferencien successivament a monoblasts, promonòcits, monòcits i macròfags.
- *Progenitors limfoides:* anomenats ELPs (*early lymphoid progenitors*) donen lloc als progenitors limfoides comuns (CLPs), reconeguts com els precursors més eficients de limfòcits B i cèl·lules NK de la medul·la òssia. Els ELPs migren per la colonització del timus i la iniciació de la limfopoesi dels limfòcits T.
- *Progenitors eritroides:* els progenitors més primitius s'anomenen unitats formadores de colònies eritroides (BFU-E), que mantenen una alta taxa de proliferació i també trobem les unitats formadores de colònies eritroides (CFU-E), que tenen un potencial de proliferació limitat. Aquests progenitors, donen lloc a precursors eritroides que donen origen als eritròcits.
- *Progenitors megacariòcits:* cèl·lules formadores de megacariòcits (meg-BFC), que donen lloc a colònies de megacariòcits (meg-CFC) que representen els progenitors finals. Els (meg-CFC) també porten a la formació de precursors poliploides que s'anomenen megacariòcits immadurs, que formen un citoplasma madur donant lloc a megacariòcits que donaran lloc a les plaquetes.

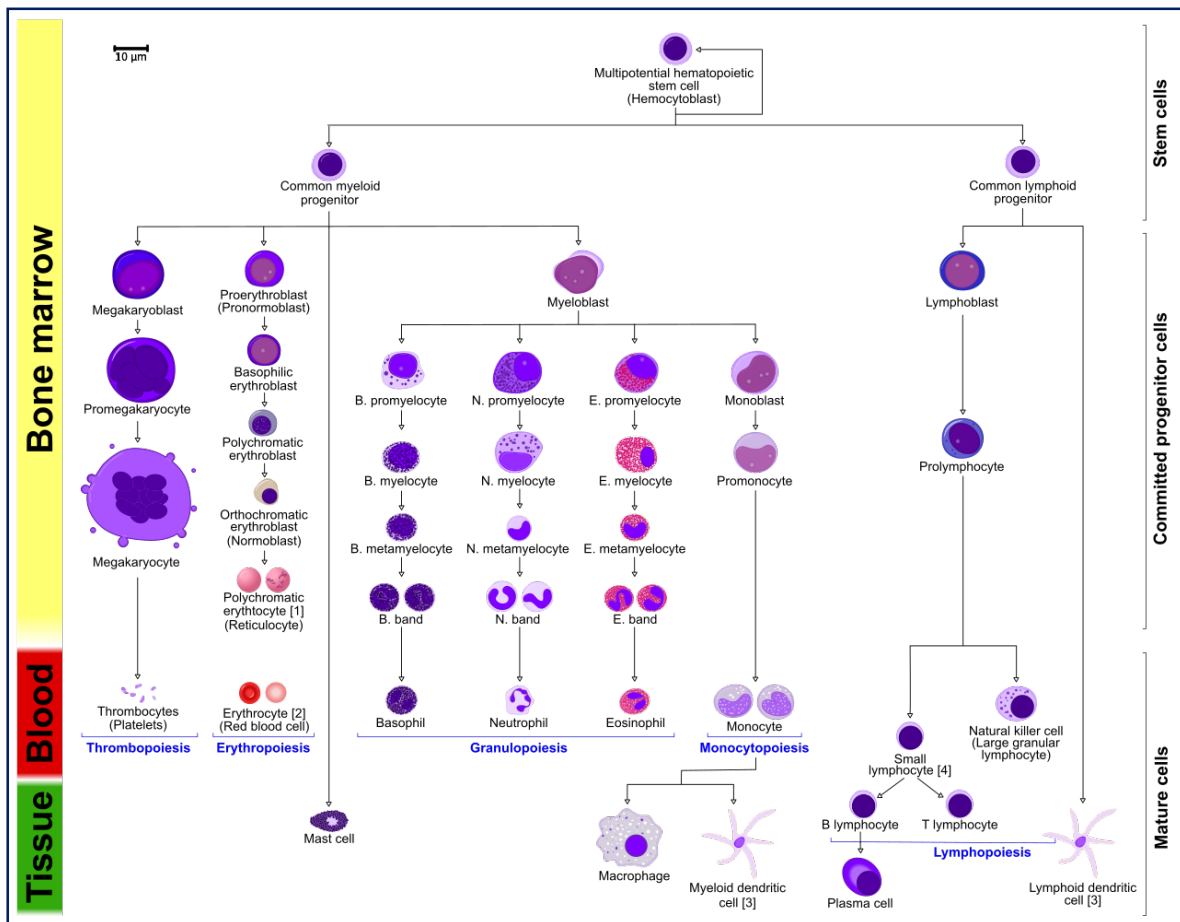


Figura 6: Esquema de l'hematopoesi (font: <https://es.wikipedia.org/wiki/Hematopoesis>)

REGULACIÓ DE LA HEMATOPOESI: en aquest punt, entre en joc els factors de creixement i el microambient medul·lar, que regulen en el adult de la hematopoesi. El microambient de la medul·la està format per un conjunt de substàncies químiques, hormonals i diferents tipus cel·lulars i és imprescindible per què les cèl·lules mare es desenvolupin i es diferenciïn cap a cèl·lules madures, i així afavorir la regulació de la hemopoesis.

Factors de creixement: els factors de creixement són molècules molt importants per la formació de les cèl·lules sanguínies i poden actuar sobre la proliferació, maduració i funcions sobre elles mateixes.

Els factors duen a terme la seva funció mitjançant receptors de membrana de la cèl·lula diana específics per cada un d'ells, que tindrà un paper important en la

regulació cel·lular. Avui en dia es coneixen 25 tipus de factors de creixement diferents (citosines), la majoria de forma sinèrgica entre ells (és a dir que el seu efecte es suma).

Els factors reguladors de la hematopoesi es poden classificar en tres grans grups: els factors estimuladors, que indueixen per ells mateixos la proliferació de determinats progenitors hematopoètics, els factors potenciadors, que augmenten la acció dels factors estimuladors, i per últim els factors inhibidors que tenen una acció de control sobre la producció de la cèl·lula.

Els factors estimuladors més importants son:

- **EPO *eritropoetina***: és el regulador més important durant la eritropoesis, ja que estimula la proliferació i la diferenciació entre eritròcits no madurs, estimula el creixement de les cèl·lules progenitores de colònies d'eritròcits a proeritroblasts.
- **GM-CSF**: factor estimulador de colònies granulomonocítiques: actua sobre el creixement i diferenciació de progenitors hematopoètics, participa en la regulació de la resposta immune, augmenta la funció dels neutròfils mitjançant fagocitosi, incrementa la citotoxicitat d'eosinòfils i monòcits.
- **G-CSF**: factor estimulador de colònies granulocítiques: format per uns tipus de cèl·lules endotelials, monòcits, macròfags i fibroblasts que el lluiten contra estímuls infecciosos o sota la inducció de una altre citosina, actua com a factor de creixement específic de línia, estimulador la proliferació, la maduració i la diferenciació de la sèrie neutròfila.
- **M-CSF**: factor estimulador de colònies macrofàgiques: específic per les cèl·lules de llinatge de macròfag, aquest és sintetitzat per fibroblasts, cèl·lules endotelials, monòcits i macròfags. Tenen activitat proliferativa molt escassa.

Els factors potenciadors més importants son:

- **SCF: *Stem cell factor***: La seva activitat biològica hematopoètica radica en que augmenta la capacitat proliferativa de progenitors primitius que responen a unes altres citosines.

- **IL-1:** *Interleukina 1:* és una de les interleucines més importants en la modulació de la resposta immune, el seu funcionament és incrementar la activació de les cèl·lules T en resposta a un antigen.
- **IL-2:** *Interleukina 2:* produïda i secretada per cèl·lules T activades, és la principal responsable de la proliferació clonal de les cèl·lules T.
- **IL-4:** *Interleukina 4:* la producció de IL-4, es gràcies als fòcids Th2, que també sintetitzen IL-3, IL-4, IL-6 i GM-CSF. L'efecte de la IL-4 es produeix sobre cèl·lules de estirp limfoide , i actua sobre limfòcits B en repòs . A nivell de la hematopoesi té un efecte inhibidor sobre la proliferació de GM-CFU.
- **IL-6:** *Interleukina 6:* s'encarrega dels limfòcits T, però és capaç de sintetitzar limfòcits B, monòcits, fibroblasts, queratinòcits, cèl·lules endotelials, astròcits, cèl·lules sinergia . La IL-6, és el principal inductor de resposta de fase aguda en el intestí, augmenta el nombre de cèl·lules progenitores megacariocítiques, la mida dels megacariòcits i el numero de plaquetes circulants.
- **IL-7:** *Interleukina 7:* actua en la limfopoesi com un factor regulador de la diferenciació de cèl·lules B i T.
- **IL-8:** *Interleukina 8:* és produïda per monòcits, neutròfils, i cèl·lules NK, per macròfags alveolars, cèl·lules endotelials i fibroblasts. Aquesta té capacitat d'activar la desgranulació de neutròfils i afavorir la quimiotaxi.
- **IL-9:** *Interleukina 9:* produïda per cèl·lules T, i actua sobre progenitors primitius de línia eritroide i megacariocítica.
- **IL-10:** *Interleukina 10:* s'origina a partir de cèl·lules Th2 activades, CD8+, cèl·lules T i B i macròfags. La seva funció és inhibir la producció de citosines, promou la proliferació de cèl·lules B i la producció d'anticossos, suprimeix la immunitat cel·lular i el creixement de mastòcits.
- **IL-11:** *Interleukina 11:* produïda per cèl·lules de l'estroma i la medul·la òssia. Té una funció similar a la de l'IL-6, però té diferents efectes sinèrgics hematopoètics i trombopoetics.

Els principals factors inhibidors son:

- **INF:** *Interferó alfa, beta i gamma:* l'alfa i el beta es coneixen com interferons de tipus I: principals responsables de l'acció antiviral dels interferons, i els gama de tipus II: secretat per cèl·lules T i CD8+.
- **TNF:** *Factor de necrosis Tumoral alfa i beta:* Aquest factor engloba una sèrie de proteïnes produïdes per cèl·lules del sistema monòcit-macròfag i de limfòcits T.
- **MIP:** *Macrophage Inflammatory Protein:* Proteïnes secretades pels macròfags, que tenen acció potenciadora sobre el desenvolupament dels progenitors hematopoètics madurs.
- **TGF:** *Transforming growth factor:* Aquest factor el podem dividir en alfa i beta:
 - TGF- β : proteïnes que tenen efecte proliferant en molts tipus de cèl·lules mesenquimàtiques i epitelials. Aquests efectes faran que hi hagi una disminució de secreció de immunoglobulines i de la supressió de hematopoesi.
 - TGF- α : els carcinomes son les fonts predominant.

Aquestes molècules reguladores de la síntesi de cèl·lules de la sang es poden veure resumides a la figura 7. Veiem com trobem factors estimuladors i inhibidors que regulen aquesta hematopoesi.

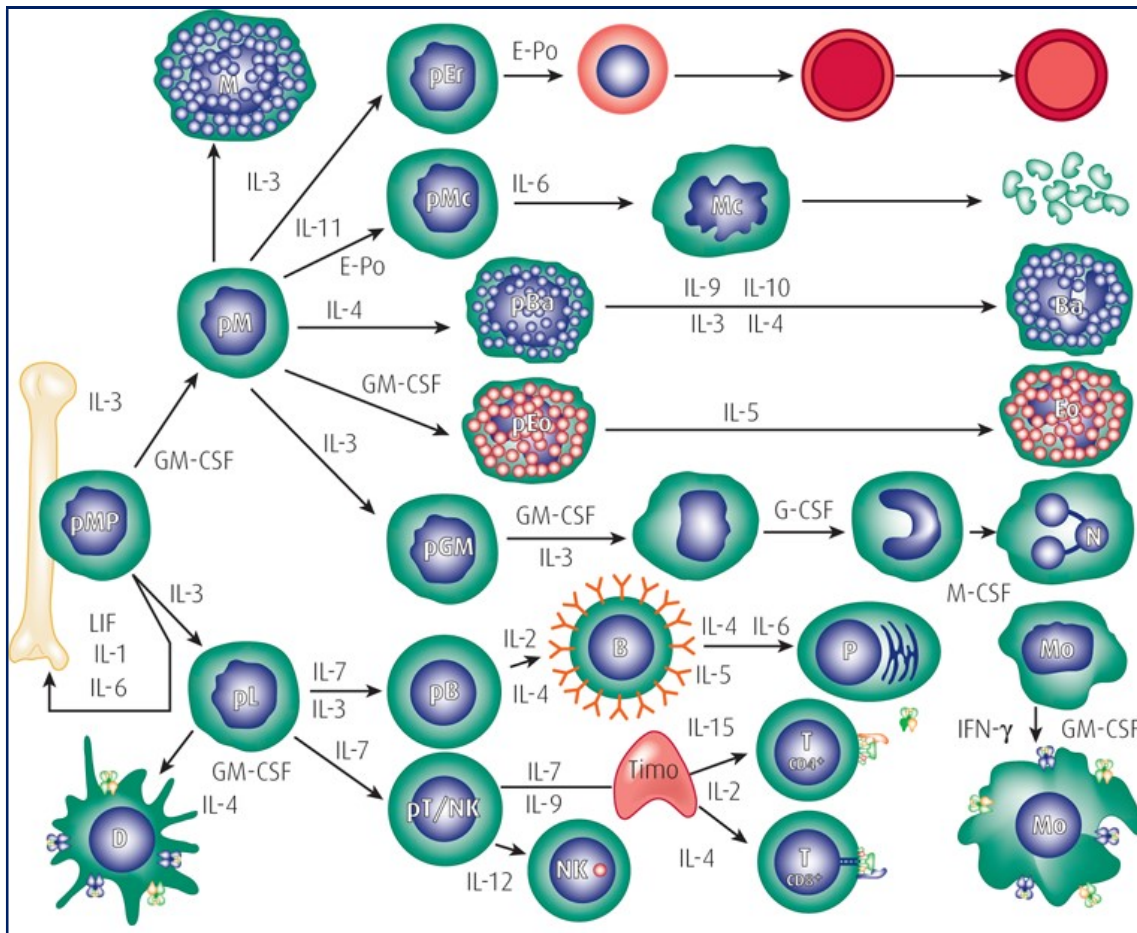


Figura 7: Esquema dels Factors Estimuladors i Inhibidors de l'Hematopoesi (font: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1506§ionid=98183011>)

1.3.2. PRINCIPALS PARÀMETRES SANGUÍNIS EN HEMATOLOGIA CLÍNICA. INTERPRETACIÓ DE LA HEMATIMETRIA

L'hemograma és un conjunt de determinacions del laboratori que mesura els elements formes de la sang (cèl·lules). Avui en dia disposem de comptadors que treballen a gran velocitat i de manera fiable que determinen múltiples paràmetres hematològics bàsics que serveixen per detectar alteracions quantitatives i qualitatives de cèl·lules sanguínies.

La majoria de comptadors centren el seu funcionament en un d'aquests principis: impedància elèctrica i la dispersió d'un feix de llum. Això ens dona informació sobre el recompte, la mida, la distribució i la classificació cel·lular.

L'hemoglobina es determina mitjançant espectrofotometria mentre que d'altres paràmetres son calculats a través dels ja mesurats.

Els paràmetres bàsics de l'hemograma son: recompte d'eritròcits, leucòcits i plaquetes; altres paràmetres de la sèrie eritroide relacionats amb la mida i la quantitat d'hemoglobina i el diferencial leucocitari (neutròfils, limfòcits, monòcits, eosinòfils i basòfils).

PARÀMETRES DE LA SÈRIE ERITROIDE

Hemoglobina (Hb): proteïna que transporta l'oxigen als teixits a través de la sang amb una molècula de Ferro. Quan la quantitat d'hemoglobina està per sota del límit inferior de referència segons edat, sexe i localització geogràfica es pot dir que hi ha algun tipus de anèmia.

Volum corpuscular mig (VCM): és el valor mitjà del volum dels hematies. Per determinar la mida dels hematies, actualment els analitzadors hematològics els mesuren un per un. El VCM és un paràmetre fonamental que serveix per la classificació morfològica de les anèmies i orientar-ne les seves possibles causes.

Hematòcrit (Hto): és el volum que ocupen les hematies en el volum total de sang expressat en (%). És pot determinar per centrifugació amb marc o multiplicant el VCM pel recompte d'hematies.

Hemoglobina corpuscular mitja (HCM): és el valor mitjà del contingut d'hemoglobina que té cada eritròcit. Es calcula utilitzant els comptadors automàtics que ho fan a partir del quocient entre l'hemoglobina i el numero d'hematies. L'HCM participa en el diagnòstic i classificació de les anèmies.

Concentració de hemoglobina corpuscular mitja (CHCM): és la concentració mitja d'hemoglobina en un volum determinat d'hematies. És calcula a partir del quocient entre la concentració d'hemoglobina i l'hematòcrit.

Amplitud de distribució eritrocitària (ADE, IDE, RDW): és la mesura del grau de dispersió de la distribució d'hematies, informa de l'homogeneïtat o heterogeneïtat de la mida dels eritròcits. Per minimitzar l'error que produeix el VCM (poden haver-hi

eritròcits de mides diferents barrejats), s'ha d'informar del valor de l'ADE que s'utilitza com a complement en la classificació de les anèmies.

Totes aquestes magnituds es troben resumides en les taules 1 i 2.

	Hemoglobina (g/dl)	Hematocrit (%)	Hematies ($\times 10^{12}/L$)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)
Nadó (a terme)	16 \pm 3	54 \pm 10	5,6 \pm 1,0	107	34 \pm 5	33 \pm 2,5
7 dies a 3 mesos	15 \pm 2	38 \pm 6	4,0 \pm 0,8	92 \pm 6	30 \pm 4	33 \pm 3
Fins a 1 any	12 \pm 1	40 \pm 4	4,4 \pm 0,8	78 \pm 8	26 \pm 4	33 \pm 2,5
1 a 12 anys	13 \pm 1	40 \pm 4	4,8 \pm 0,7	85 \pm 8	27 \pm 3	33 \pm 2,5
Dones no gestants	14 \pm 2	40 \pm 5	4,8 \pm 1,0	89 \pm 9	30 \pm 3	34 \pm 2,5
Homes	15 \pm 2	50 \pm 7	5,5 \pm 1,0	90 \pm 9	30 \pm 3	34 \pm 2,5

Taula 1: valors de normalitat en els paràmetres de la sèrie eritroide de l'hemograma

PARÀMETRES DE LA SERIE BLANCA

Leucòcits o Glòbuls blancs; son les cèl·lules de la sang que s'encarreguen de la resposta immune o mecanisme de defensa del cos davant d'agressions externes (infeccions fonamentalment) . Les principals alteracions son la **Leucocitosi** o diferència del recompte de leucòcits per sobre dels límits superiors dels valors de referència segons edat i sexe. Pot ser causada per un augment d'alguna de les subpoblacions de leucòcits.

	Leucòcits X $10^9/L$	Neutròfils X $10^9/L$	Eosinòfils X $10^9/L$	Basòfils X $10^9/L$	Monòcits X $10^9/L$	Limfòcits X $10^9/L$
Adults	4,5 – 11,0	1,8 – 7,7	0,05 – 0,45	0,01 – 0,20	0,05 – 0,8	1,0 – 4,8
Nens de 12 mesos	6,0 – 17,5	1,5 – 8,5	0,05 – 0,7	0,01 – 0,20	0,05 – 1,1	4,0 – 10,5

Nens de 4 anys	5,5 – 15,5	1,5 – 8,5	0,02 – 0,65	0,01 – 0,20	0,05 – 0,8	2,0 – 8,0
Nens de 6 anys	5,0 – 14,5	1,5 – 8,0	0,05 – 0,65	0,01 – 0,20	0,05 – 0,8	1,5 – 7,0
Nens de 10 anys	4,5 – 13,5	1,8 – 8,0	0,05 – 0,6	0,01 – 0,20	0,05 – 0,8	1,5 – 6,5

Taula 2: valors de normalitat en els paràmetres de la sèrie leucocitària de l'hemograma

Les causes més freqüents de leucocitosi son:

- Processos infecciosos causats per bacteries i fongs
- Processos infecciosos causats per virus
- Processos reactius i inflamatoris aguts i crònics
- Fàrmacs
- Leucèmies agudes i/o cròniques
- Neoplàsies hematològiques
- Neoplàsies no hematològiques

Variacions fisiològiques del retorn leucocitari; el nombre absolut de leucòcits en una persona es pot veure influït per diferents situacions fisiològiques o patològiques. Aquest canvi es produeix segons sigui la situació del pacient. Per exemple, l'estrès o l'exercici intens produeixen més leucòcits, augmentant la concentració de neutròfils. Els fumadors tenen més leucòcits que els no fumadors, afectant al percentatge de neutròfils, limfòcits i monòcits. Les dones fèrtils tenen més leucòcits que els homes en condicions normals i la situació s'inverteix després de la menopausa. Els nens també tenen una xifra més gran de leucòcits que els adults, sobretot de limfòcits ja que la seva medul·la no es prou madura i ha de fer front a més infeccions víriques.

Augment d'una subpoblació leucocitària: Un augment en la concentració absoluta o el nombre de cèl·lules és un *augment absolut* mentre que si és un augment només en el percentatge d'un tipus cel·lular és un *augment relatiu*.

Neutrofilia: És un augment de la concentració absoluta de neutròfils per sobre del límit normal tenint en compte l'edat i la raça. Els primers 5-7 anys després del naixement la mitjana de neutròfils és de $11 \times 10^9/L$ i a mesura que transcorre el temps s'igualava progressivament amb els adults.

Eosinofília: És la xifra total d'eosinòfils en sang perifèrica superior a $0,5 \times 10^9/L$ que pot ser provocada per malalties al·lèrgiques o atòpiques, malalties de la pell, parasitosis, ingesta de determinats fàrmacs, neoplàsies, síndrome hipereosinofílic primari etc...

Basofília: La basofília es dona quan la xifra de basòfils en sang perifèrica és superior a $0,20 \times 10^9/L$ i s'observen freqüentment en síndromes mieloproliferatius.

Limfocitosis: És l'augment de la xifra de limfòcits totals per sobre de $5,0 \times 10^9/L$ en l'adult i $8,0 \times 10^9$ en els nens. És fisiològica en la infància, i podem observar-la en infeccions causades per virus i en la leucèmia limfoide crònica (LLC).

En aquest treball de recerca em centraré més específicament en la **Limfocitosi**. Els valors de limfòcits d'un adult estan entre el 21-51%, i la seva alteració per excés s'anomena limfocitosi mentre que la seva alteració per defecte s'anomena limfopènia.

La limfocitosi és una alteració per excés dels limfòcits dins de l'organisme del pacient, i pot ser absoluta o relativa. L'absoluta es denomina quan hi ha un augment global del número de limfòcits, en canvi la relativa es denomina quan es detecta un augment en el percentatge, en relació amb la resta de cèl·lules hemàtiques. Això no vol dir que hi ha hagut un augment de limfòcits, només que la quantitat i relació entre aquests i les cèl·lules hemàtiques està descompensat.

Hi ha diferents causes de la limfocitosi, les més comuns son:

- Limfocitosis fisiològiques
- Limfocitosis infeccioses: causada per bacteris, virus i toxoplasmosi.
- Limfocitosi no infeccioses: causades per malalties hematològiques, endocrines, tòxiques, autoimmunes, neurològiques, ruptura de braç i tabaquisme.

La limfocitosi només es pot diagnosticar mitjançant un anàlisi de sang en un laboratori clínic que posteriorment serà processat pels professionals per arribar al diagnòstic.

Normalment en gairebé tots els casos es fa servir la prova de l'hemograma que és una prova automatitzada.

Monocitosis: Es duu a terme quan la xifra de monòcits en la sang perifèrica supera el límit de referència que és $0,9 \times 10^9/L$. És fisiològic en un nadó, i apareix en la recuperació d'una infecció aguda i després del tractament de quimioteràpia.

La **Leucopènia** és la disminució de número de leucòcits per sota del límit inferior del valor de referència segons sexe, edat i raça. Es pot enfocar en global o només en un tipus de cèl·lula.

Les causes més freqüents de leucopènia son:

- Processos infecciosos bacterians severs
- Infeccions virals
- Aplàsia medul·lar, idiopàtica o secundària
- Fàrmacs
- Immunodeficiències congènites i adquirides

La detecció de **Cèl·lules anormals**, detectades pels comptadors hematològics es fa mitjançant una sèrie d'alarmes (valors qualitius). La presència d'alarmes als analitzadors solen anar relacionades amb la dispersió anòmala de la llum per part de la cèl·lula anormal i/o per la distribució del material nuclear atípic d'aquest tipus de cèl·lula. En aquests casos és necessària la correcta identificació al microscopi òptic d'aquestes cèl·lules per poder descriure'n les alteracions morfològiques. Ampliaré aquesta descripció en el següent apartat d'examen de la morfologia de sang perifèrica.

PARÀMETRES DE LA SERIE PLAQUETAR

Els trombòcits o plaquetes son fragments de megacariòcit madur que des de la medul·la òssia allibera aquests petits trossets a sang perifèrica. Les alteracions més habituals a l'hemograma tenen relació amb la seva concentració.

Trombocitosi és l'augment del número de plaquetes per sobre de $450 \times 10^9/L$.

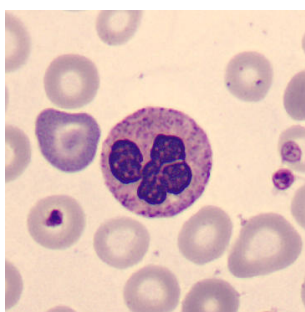
La **Trombopènia** és el descens en el recompte de plaquetes per sota de $130 \times 10^9/L$; pot ser per disminució en la producció a la medul·la òssia o per excés de destrucció perifèrica. Pot ser produïda per mecanismes immunes o no immunes.

1.3.3. EXAMEN MORFOLÒGIC DE LA SANG PERIFÈRICA

Quan es detecta alguna alteració quantitativa o numèrica a l'hemograma i/o veiem alguna alarma de l'analitzador, cal fer una observació de la sang perifèrica al microscopi òptic. Quan es fa aquest anàlisi de la sang perifèrica s'han de mirar les tres sèries (eritroide, leucocitària i plaquetar) sigui quina sigui l'alteració que ens ha fet fer aquesta revisió.

A la sang perifèrica s'analitza la morfologia de les cèl·lules i se'n fa una descripció en relació a la patologia que es sospita. Per això cal saber com és la forma normal de totes elles.

Neutròfils: nuclis dividits en 2-5 lòbuls i units per ponts de cromatina molt fins, madura i condensada. Presenta un citoplasma rosa pàl·lid i els orgànuls son rosats amb granulació molt fina. Poden tenir alteracions morfològiques adquirides o hereditàries, i amb alteració funcional o sense.



Imatge 1: fotografia de un Neutròfil morfològicament normal (font pròpia)

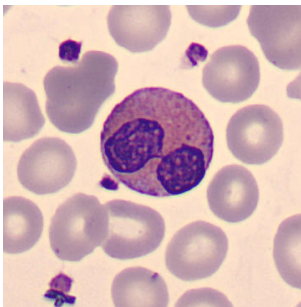
Les principals alteracions morfològiques dels neutròfils son la **Hipersegmentació** amb més de 5 lòbuls al nucli. És relacionen amb el dèficit de vitamina B₁₂ i àcid fòlic. També pot rebre el nom de gegantisme cel·lular; la **Granulació tòxica** o reforç de la granulació que normalment presenten els neutròfils. Està relacionada amb infeccions, cremades o carcinomatosis generalitzada. O la podem observar de manera fisiològica

en la gestació i la **Desgranulació**, presència de neutròfils d'aparença blava hipogranular amb granulació citoplasmàtica irregular.



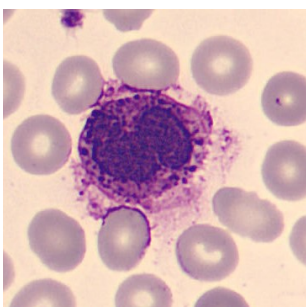
Imatge 2: Hipersegmentació, desgranulació i granulació tòxica als neutròfils (font pròpia)

Eosinòfils: tenen un nucli bilobulat amb cromatina madura i condensada. Té un citoplasma amb grànuls acidòfils i refringents que l'ocupen tot.



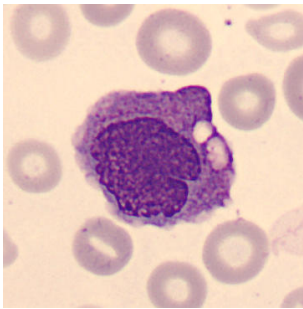
Imatge 3: Fotografia de un Eosinòfil morfològicament normal (font pròpia)

Basòfils: tenen un nucli lobulat, i el seu citoplasma conté grànuls de color lila que ocupen casi tot el citoplasma. La seva alteració més freqüent es la desgranulació.



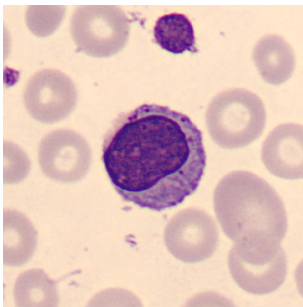
Imatge 4: Fotografia de un Basòfil morfològicament normal (font pròpia)

Monòcits: son cèl·lules més grans que els limfòcits i més petits que els granulòcits, que tenen el nucli no segmentat, de forma ovalada, lobulada o arronyonada. Tenen un citoplasma ample, de color blau clar o gris una granulació fina atzuròfila. Tenen una cromatina menys condensada que la dels limfòcits i granulòcits, i acostumen a presentar vacúols citoplasmàtics. És poden diferenciar a macròfags en els teixits. Actuen en defensa de les infeccions bacterianes o fúngiques i son capaços de fer fagocitosi.



Imatge 5: Fotografia de un Monòcit morfològicament normal (font pròpia)

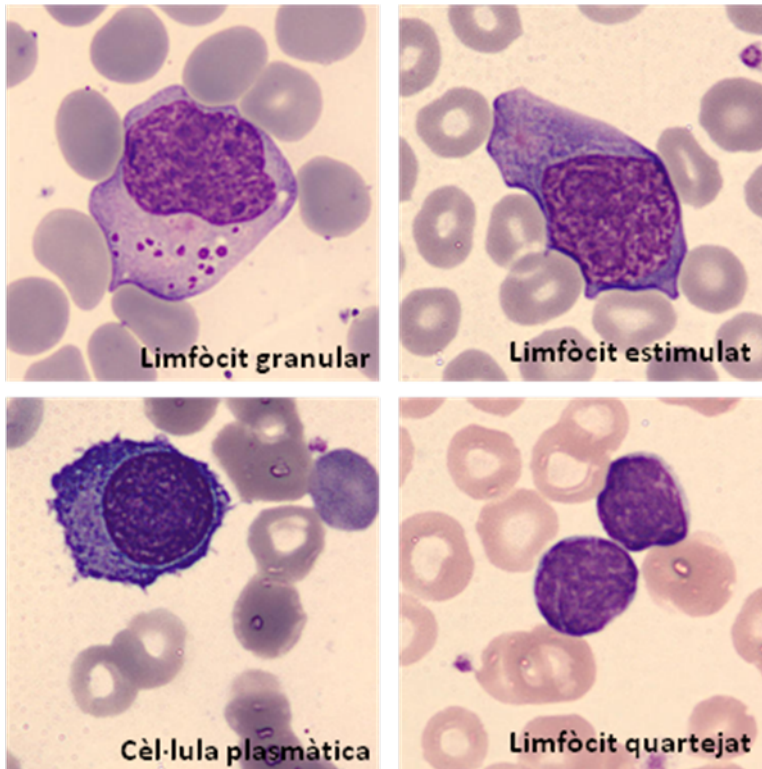
Limfòcits: son més petits que la resta de leucòcits i el seu nucli es rodo, amb cromatina madura i condensada. Tenen un citoplasma agranular, escac i de color blau clar, i la RNP és bastant elevada.



Imatge 6: Fotografia d'un Limfòcit morfològicament normal (font pròpia)

Les principals alteracions dels limfòcits son morfològiques, **Limfòcits d'aspecte activat**, limfòcits reactius, amb una mida augmentada, i la cromatina condensada més o menys i es poden observar nuclèols. Té un citoplasma hiperbasòfil i la relació nucli-citoplasma baixa. La podem trobar en infeccions víriques fonamentalment i en edats pediàtriques sense significat patològic; **Limfòcits granulars**, més grans que els limfòcits, la cromatina nuclear menys densa i amb la presència de granulació citoplasmàtica. Son limfòcits T citotòxics o NK, i es poden veure augmentats en la sang perifèrica; **Cèl·lules**

plasmàtiques, cèl·lules que deriven de la maduració dels limfòcits B, que son de mida mitjana però més grans que els limfòcits. Tenen un nucli rodo i excèntric, i un citoplasma hiperbasòfil amb un *arcoplasma* (zona pàl·lida al costat del nucli) i **Ombres de Gümprecht**, restes nuclears de limfòcits fràgils que es trenquen a l'estendre la mostra. S'observen freqüentment en la leucèmia limfoide crònica (LLC).



Imatge 7: morfologia dels diferents limfòcits anormals que es poden trobar a sang perifèrica (font pròpia)

Pel que fa a les alteracions morfològiques de la sèrie eritroide, destaquem:

- **alteracions de la mida: Anisocitosi** que indica la desigualtat de mides entre els hematies; **Micròcits** o presència predominant d'hematies de diàmetre menor a 6 micròmetres i un VCM inferior als 80 fl; **Macròcits** amb predomini d'hematies de diàmetre entre 8-11 micròmetres i VCM major a 100 fl.
- **alteracions de la forma: Poiquilocitosi** és la desigualtat en la forma dels hematies. Les formes més comuns son les següents: Esferòcits, El·liptòcits, Estomatòcits, Ovalòcits, Dacriòcits, Esquistòcits, Hematies espiculats: Equinòcits i Acantòcits, Drepanòcits i Excentròcits.

- **alteracions en la concentració d'hemoglobina: Hipocromia**, hematies tenyits més dèbilment pel seu menor contingut d'hemoglobina; **Hipercromia**: que es tenyeixen més intensament pel seu major contingut en hemoglobina i **Policromasia** o presència d'hematies en color blau grisenc. Normalment correspon a la presència d'eritròcits joves o amb alteració de la maduració normal. Son més grans que els hematies madurs i la seva presència significa una activitat medul·lar augmentada. La xifra normal de reticulòcits en sang perifèrica oscil·la entre el 0,5-2% del total d'hematies.
- **Eritròcits nucleats o Eritroblasts**, son precursors dels hematies madurs que estan a la sang perifèrica, i en un adult sa només estan a la medul·la òssia. En la sang perifèrica els veiem que acaben de néixer i en algunes malalties on hi hagi una alta demanda medul·lar.

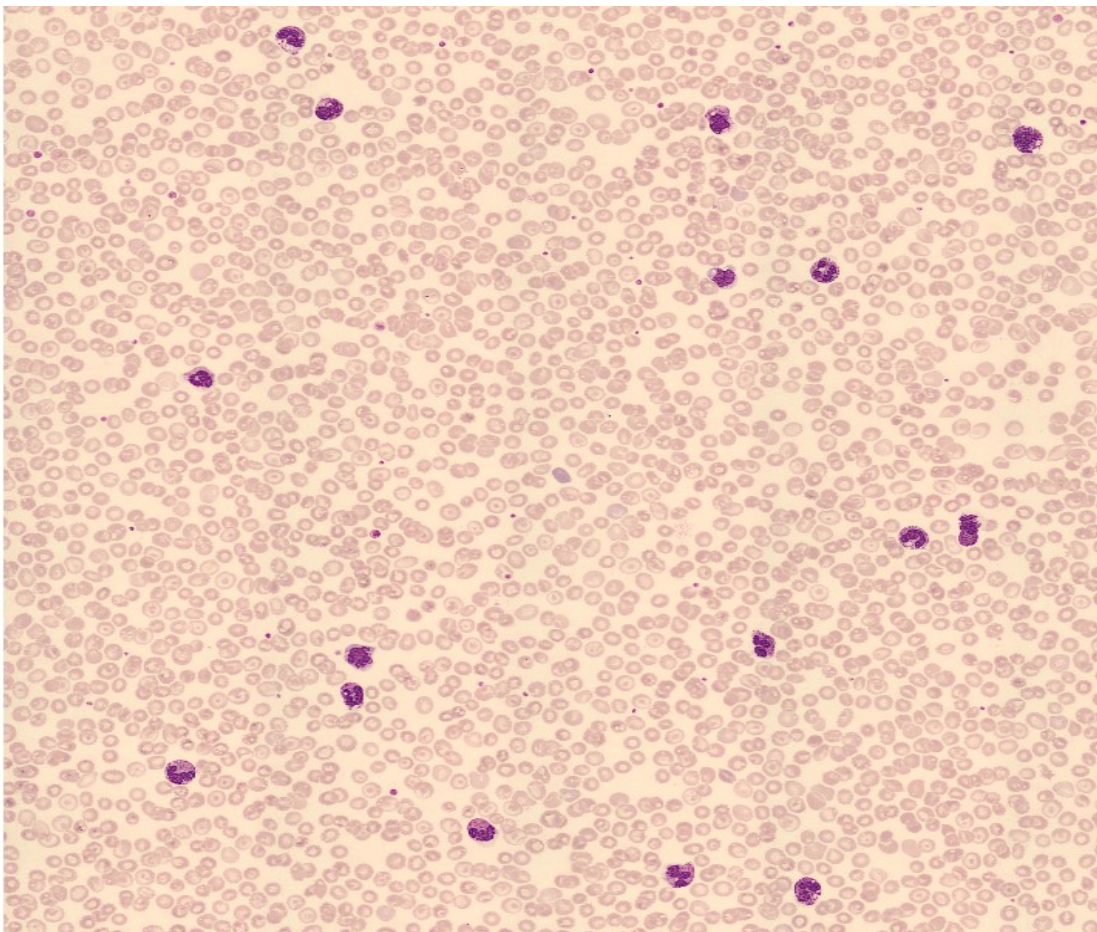


Figura 8 : imatge a petit augment dels eritròcits i leucòcits (cèl·lules més fosques); es veuen diferents formes i tamanys (anisocitosi i poiquilocitosi) (font pròpia)

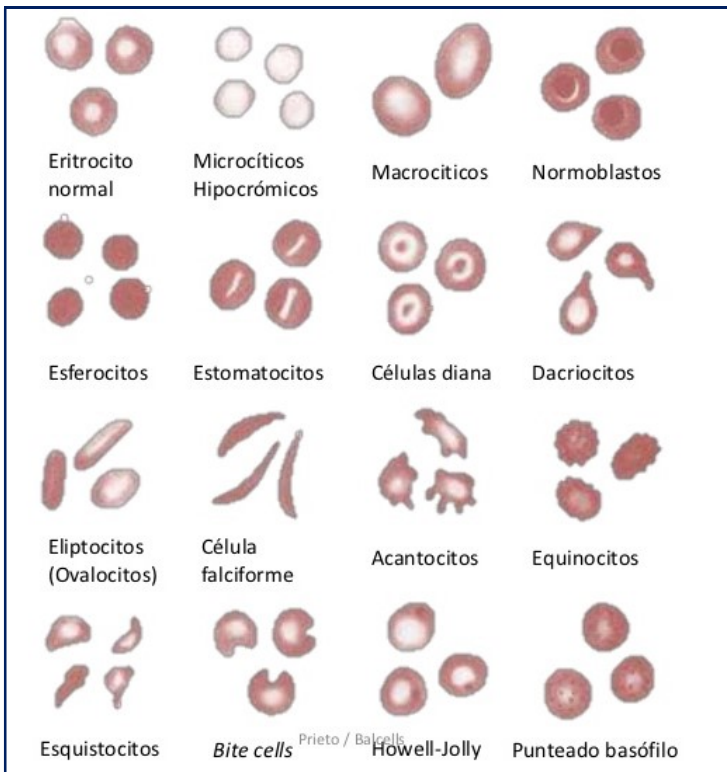
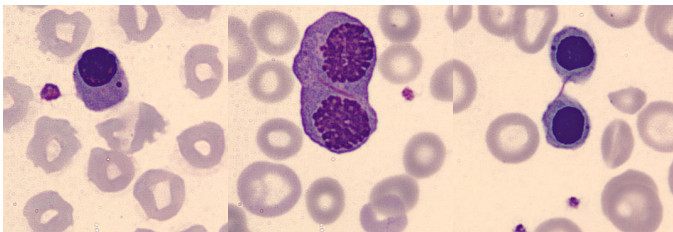


Figura 9: diferents morfologies dels eritròcits que es poden trobar en sang perifèrica (<https://pt.slideshare.net/ArturoLennon/hematologa-clnica/18>)

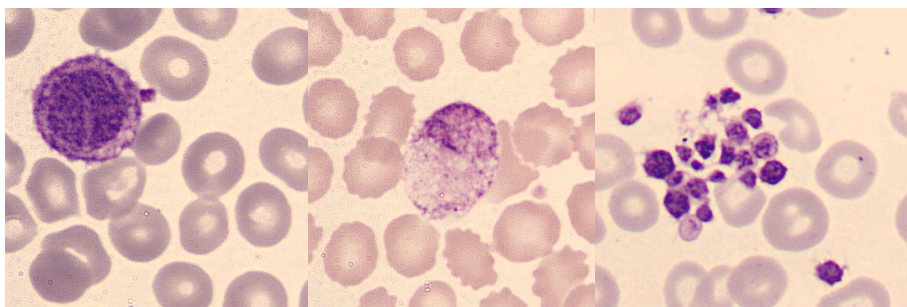


Imatge 8: imatges corresponents a eritròcits nucleats o eritroblasts, en diferent estadi maduratiu (font pròpia)

Finalment, pel que fa la morfologia plaquetar cal dir que les plaquetes tenen origen a partir de la fragmentació del citoplasma del *megacariòcit*. Son els elements sanguinis mes petits (1-3 micròmetres). Contenen una fina granulació atzuròfila que es situa a la zona central que anomenem *granulòmer*, que està rodejada per una zona de citoplasma pàl·lid anomenat *hialòmer*.

Les alteracions morfològiques més significatives són la presència de **Macrotrombòcits**, plaquetes grans, de mida superior als 15 micròmetres; les **Plaquetes displàsiques**, que fa referència a la dismòrfia plaquetar (plaquetes sense la seva granulació típica o amb presència de pseudòpodes) i els **Agregats plaquetaris**. Quan extraïem sang perifèrica trobem les plaquetes separades entre elles. Però en alguns casos es produeix una agregació plaquetar espontània o induïda, que fa disminuir de manera errònia la xifra de plaquetes.

Per resoldre aquest problema cal realitzar un frotis de sang perifèrica que ajudarà a confirmar la presència de aquestes agregacions plaquetaris i realitzar el seu recompte amb un tub que contingui citrat sòdic que funcioni com anticoagulant per precisar el número de plaquetes de la mostra que volem analitzar.



Imatge 9: macrotrombòcit, plaqueta displàsica i agregats de plaquetes respectivament (d'esquerra a dreta) (Font pròpia)

1.3.4. FONAMENT BÀSIC DE LES PRINCIPALS TECNOLOGIES AL LABORATORI D'HEMATIMETRIA

Al laboratori d'Hematimetria i com s'ha comentat en el segon punt de la introducció, el conjunt de proves fonamentals constitueixen l'Hemograma. Per fer-ho es fan servir autoanaltzadors que mitjançant diferents tecnologies donen valors quantitius i qualitius de cada pacient analitzat.

Les tècniques usades per aquests analitzadors són la Impedància, la Citometria de flux i VCSn amb *Automated Intelligence Morphology (AIM)*.

1.3.4.1. IMPEDÀNCIA

La impedància consisteix en la mesura de la resistència que mostren les cèl·lules quan se les fa passar per un espai entre dos elèctrodes amb corrent continua; en funció del tamany de la cèl·lula s'origina un pols del que podem mesurar duració, amplitud i forma. Això a Hematimetria es coneix com el Principi Coulter (any 1956, Wallace Coulter, US). Cal tractar la mostra del pacient amb una solució electrolítica que permeti la conducció de la corrent. Aquesta metodologia la podem veure representada amb el seu fonament bàsic a la figura 10.

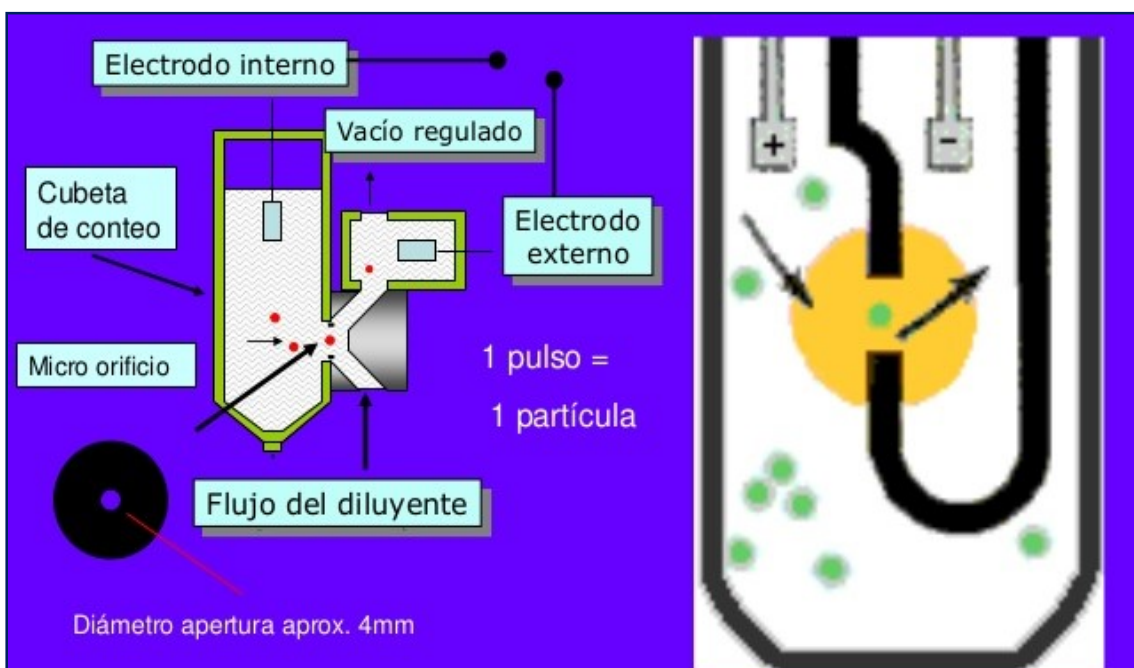


Figura 10: esquema del funcionament del camp elèctric entre dos elèctrodes i la mesura dels polsos cel·lulars a través de l'orifici. (Font: <https://es.slideshare.net/ymonteza2/automatizacin-en-hematologa>)

Les dades son transformades per algoritmes matemàtics obtenint gràfiques en què es relaciona el número cel·lular contat amb el volum de cada cèl·lula. Així doncs es poden agrupar per similitud de mides, essent els elements mesurats més petits les plaquetes, els mitjans els eritròcits i els més grans els leucòcits.

A la figura 11 podem observar com a partir d'un flux de cèl·lules alineades i passant per una obertura es produeixen polsos elèctrics que es transformen en gràfiques.

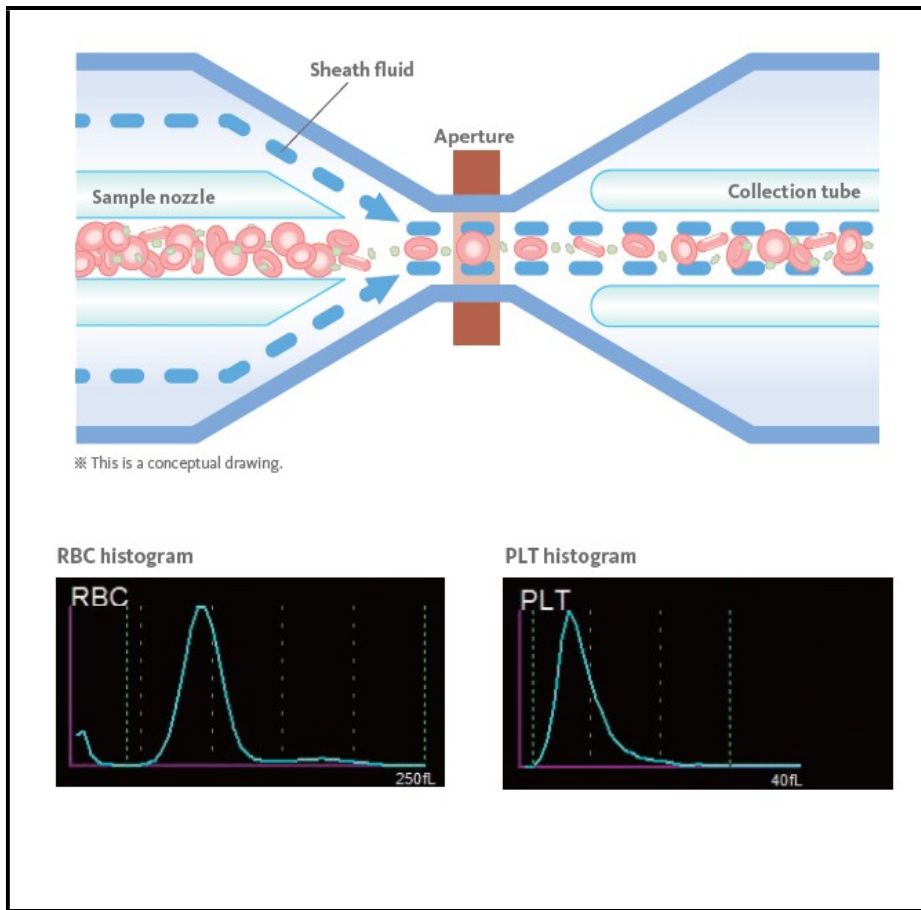


Figura 11: esquema dels gràfics per impedància del recompte cel·lular, dels eritròcits a l'esquerra i les plaquetes a la dreta. (Font: manual de l'usuari Sysmex XN Series, Kobe, Japó).

1.3.4.2. CITROMETRIA DE FLUX

És una tècnica qualitativa i quantitativa de l'anàlisi i separació de partícules que mesura de forma ràpida i sensible múltiples paràmetres de manera simultània, representada a la figura 12.

El seu funcionament consisteix en fer passar un grup de cèl·lules alineades per davant de un làser i observar i mesurar la llum que emet cada cèl·lula a mesura que passen per davant el làser, calculant així la mida, la forma i la estructura en general de la partícula, i d'altre banda, si aquestes cèl·lules han estat tenyides amb una o més d'una molècula fosforescent, el làser excitarà aquestes molècules fent així, que ens donin certa informació biològica addicional relacionada amb cada partícula individual (activitat metabòlica, contingut de ADN o la presència de alguns marcadors intracel·lulars o de superfície).

Per dur a terme aquesta prova, hem de precisar d'un Citòmetre de Flux, que serà capaç d'analitzar milers de partícules cada segon. Pot separar i identificar aquelles partícules que tinguin propietats específiques. Aquesta màquina té un funcionament similar al microscopi amb la diferencia que per formar una imatge de la cèl·lula ha de quantificar informàticament els paràmetres que vol analitzar.

Els components principals del citòmetre de flux son: un flux cel·lular; una font de llum; un detector; un sistema d'amplificació lineal o logarítmic i un ordinador per l'anàlisi de senyals. La llum que farà la cèl·lula serà convertida en una senyal digital que serà interpretada per un ordinador per la seva anàlisi.

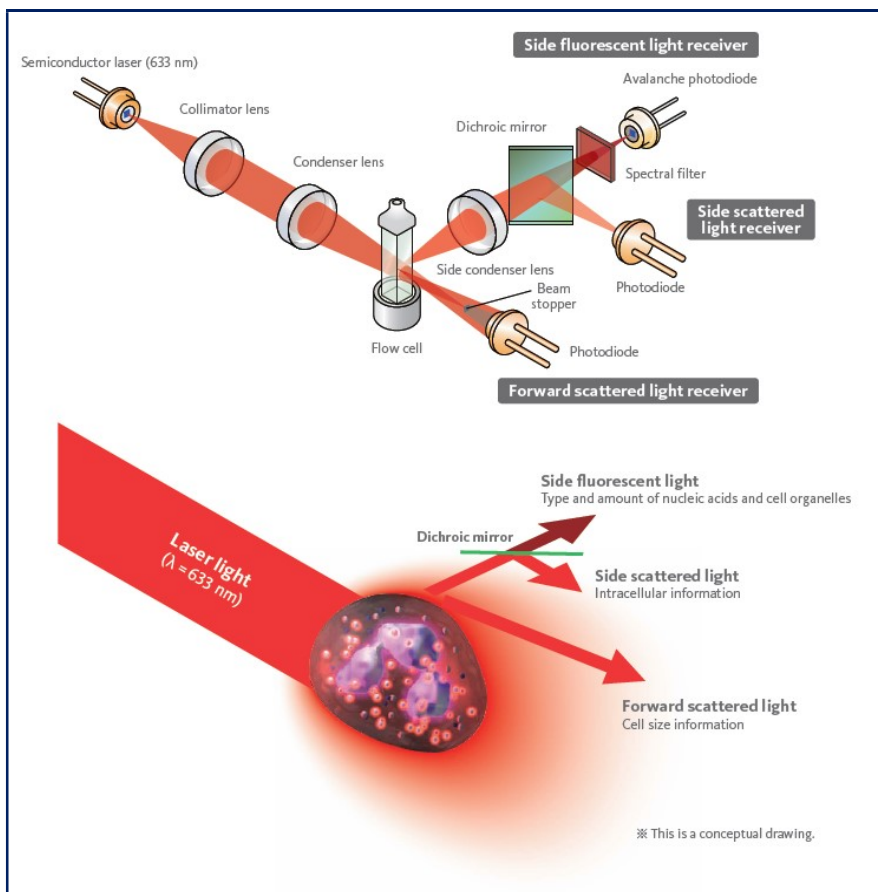


Figura 12: esquema del funcionament del Citòmetre de Flux (Font: manual de l'usuari Sysmex XN Series, Kobe, Japó).

La citometria de flux al laboratori d'hematologia es pot usar amb dos tipus de reactiu diferent en funció del què hem de fer en la mostra del pacient.

Si es troba a l'analitzador de l'hemograma, es fan servir colorants fluorescents que no son específics de les cèl·lules i ajuden al làser a seleccionar-les per mida, forma i granulació del citoplasma.

En funció d'aquests tres paràmetres l'aparell classifica els leucòcits en els 5 grups normals o fisiològics (neutròfils, limfòcits, monòcits, eosinòfils i basòfils), segons podem veure a la figura 13, on cada color representa un tipus cel·lular (ex, color rosa son limfòcits).

També en mesura la concentració i quantitat per poder comprovar segons les taules que abans he citat si estan dins dels valors de normalitat.

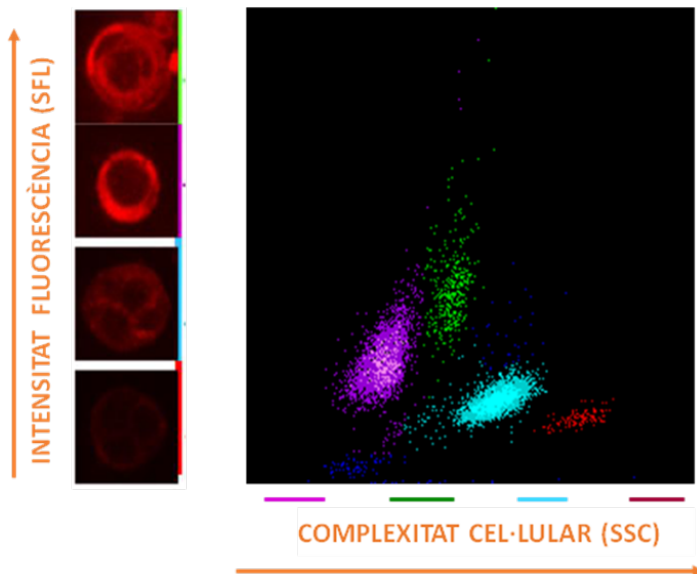


Figura 13: imatge del diferencial leucocitari analitzat en un pacient normal tenint en comte la intensitat de la llum emesa per la cèl·lula a l'eix Y (relació amb la mida) i la dispersió de la llum a l'eix X (complexitat citoplasmàtica). En rosa, limfòcits, verd els monòcits, blau clar els neutròfils i vermell els eosinòfils. Els basòfils en aquesta metodologia es veuen en un altre canal. (Font: manual de l'usuari Sysmex XN Series, Kobe, Japó).

En l'esquema representat a la figura 14, on veiem que la representació gràfica dels leucòcits ens pot ajudar també a saber quan un pacient té alguna malaltia a les cèl·lules per què l'esquema és diferent. A l'esquerra imatge dels leucòcits normals i a la dreta una mostra d'un pacient malalt.

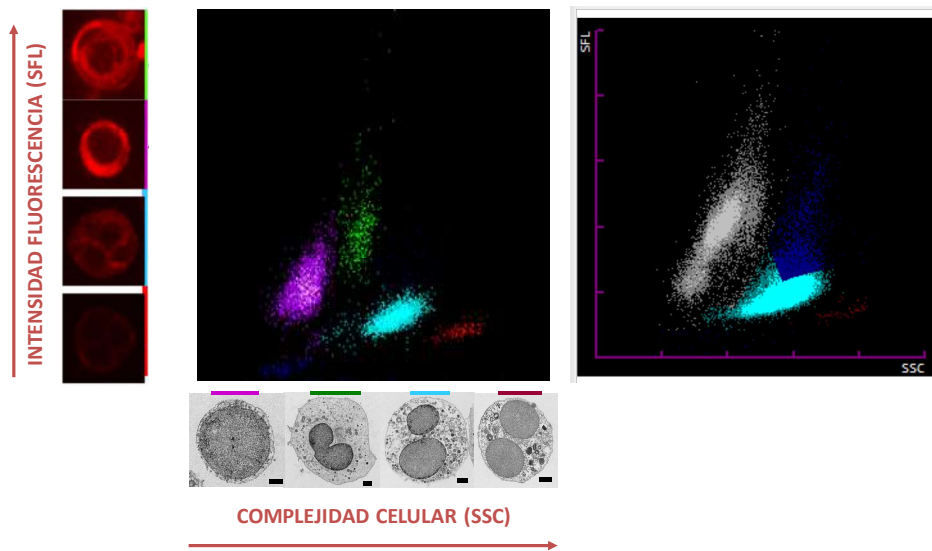


Figura 14: imatge del diferencial leucocitari analitzat en un pacient patològic on no es veuen els diferents grups de colors de les cèl·lules (Font pròpia).

Si el que volem és aprofitar la capacitat multiparamètrica de la citometria de flux per analitzar moltes cèl·lules en poc temps, podem usar marcadors fluorescents específics per les cèl·lules que volem analitzar. Com a exemple, de tots els limfòcits que té un pacient podem usar marcadors com el CD3 (limfòcits T), CD19 (limfòcits B) i CD56 (limfòcits NK) per poder diferenciar quin tipus de limfòcit exactament és i si la seva proporció en el pacient és la correcta. Aquests marcadors son anticossos que es troben a la membrana, nucli o citoplasma de les cèl·lules.

La gran diferència en aquest cas és que cal analitzar les poblacions amb “gates”, és a dir, seleccionant un mateix tipus de cèl·lula cada vegada que vulguem saber-ne les propietats. Com que aquest anàlisi de les cèl·lules el fem usant anticossos, en aquest cas la citometria de flux s’anomena Immunofenotip Cel·lular. Aquesta tècnica la veiem representada a la figura 15, on es veuen dos colors diferents que es corresponen a dues poblacions de cèl·lules marcades amb diferents colors fluorescents.

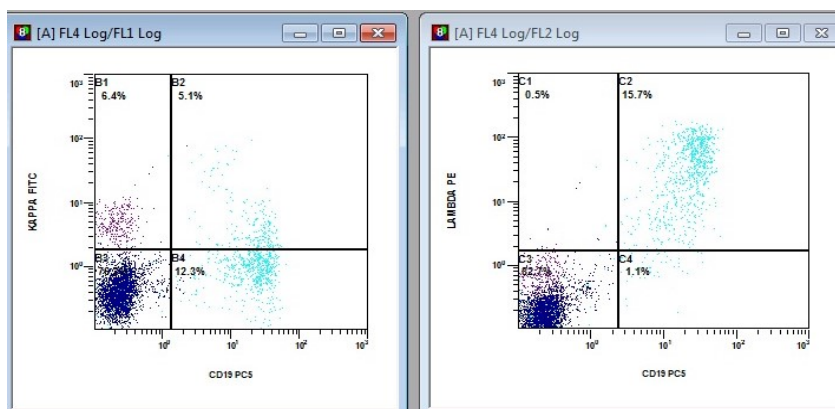


Figura 15: imatge de l'anàlisi d'una població de limfòcits amb el marcador CD19 per saber si el pacient té massa limfòcits B.

1.3.4.3. TECNOLOGIA VCS I AIM "automated intelligent morphology"

Hi ha analitzadors que enlloc de fer l'anàlisi dels leucòcits amb citometria de flux ho fan amb una tecnologia anomenada AIM de l'anglès *Automated intelligent morphology*, representada a la figura 16.

Aquesta metodologia té en conte tres mesures diferents per cada cèl·lula que provoca el pols elèctric al seu pas pel làser o feix de llum: mesura el volum cel·lular, la dispersió de la llum a través de la cèl·lula i la transmissió d'un corrent elèctric a través de la cèl·lula. Amb això s'obté informació sobre la mida cel·lular (volum), tipus de citoplasma (dispersió de la llum) i quantitat de cromatina i informació del nucli cel·lular (pas del corrent elèctric). Per tant VCS vol dir: volum, conductivitat i "scatter" de dispersió.

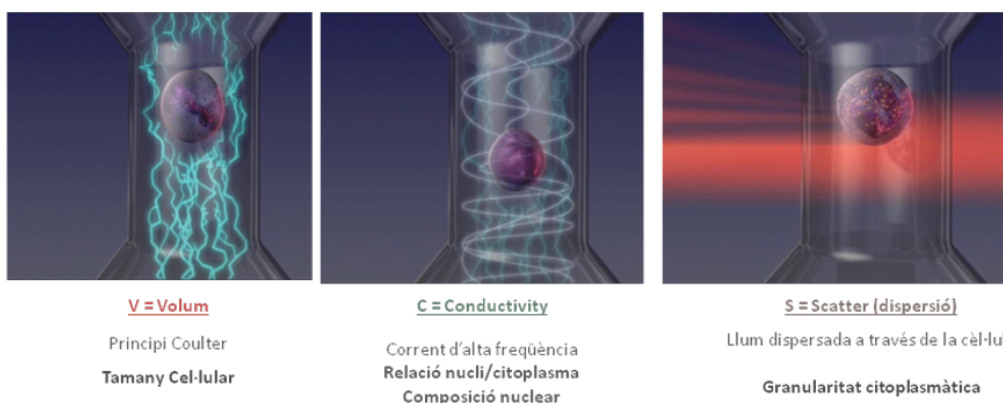


Figura 16: descripció esquemàtica de la tecnologia AIM-VCS per mesurar les cèl·lules per impedància i conductivitat. (Font: manual de l'usuari de l'aparell DxH 900 de Beckman Coulter, Miami, US).

La classificació dels diferents leucòcits en aquests aparells es fa usant aquesta triple mesura per cada cèl·lula i s'obtenen imatges visuals per poder-les interpretar com normals o patològiques, com podem veure a la figura 17.

	Tamany	Conductivitat	Dispersió (Sn)
Limfòcits	+	+	+
Monòcits	+++	++	+
Neutròfils	++	+++	++
Eosinòfils	++	+++	+++
Basòfils	+	+++	++

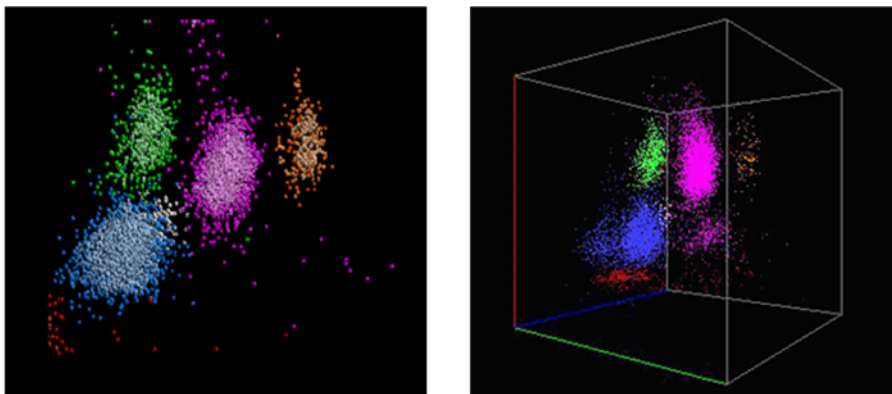


Figura 17; imatge del diferencial leucocitari d'un pacient sa tenint en compte la mesura de la llum emesa a l'eix de les Y i el volum de les cèl·lules a l'eix de les X. . (Font: manual de l'usuari de l'aparell DxH 900 de Beckman Coulter, Miami, US).

En aquest tipus de metodologia també permet veure si l'esquema dels leucòcits és diferent al que esperem i podem detectar alguna malaltia. A la figura 18 podem observar com són diferents els dos esquemes, a l'esquerra una mostra d'un pacient sa i a la dreta un pacient amb més número de monòcits, representats pel núvol de color verd, molt més abundant.

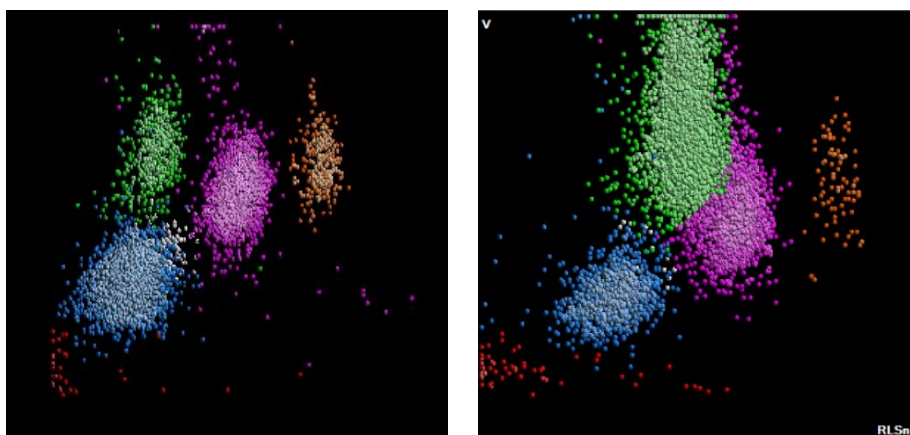


Figura 18: imatge del diferencial leucocitari analitzat en un pacient patològic on es veu que el grup de cèl·lules de color verd és molt més abundant en el cas patològic (pacient de la dreta) que en el normal (pacient de l'esquerra) (Font pròpia).

1.3.4.4. SEROLOGIA I DETECCIÓ D'ANTICOSSOS

Les malalties provocades per virus produeixen al nostre organisme l'alliberament d'unes substàncies químiques que es coneixen com anticossos o immunoglobulines. Se'n coneixen de diferent tipus: Ig A, Ig G, Ig M i Ig E. Cadascuna d'elles es troba relacionada amb un procés infecció diferent i poden ser detectades al laboratori amb una mostra de sang del pacient.

En els pacients en que es sospita una infecció vírica cal determinar les Ig M i les Ig G específiques pel germen que busquem. Quan l'infecció acaba de començar o és aguda, trobarem elevada quantitat d'Ig M; si l'infecció es troba en fase de resolució o ha deixat memòria als limfòcits, trobarem augmentada l'Ig G.

La serologia detecta i quantifica les immunoglobulines que un pacient té en el seu organisme per un virus en concret.

Aquesta tècnica es veu representada a la figura 19, on veiem com es pot saber si un pacient té al seu sèrum Ig M, Ig G o bé Ig A, usant reactius marcats amb colors fluorescents.

IgM/IgG/IgA ISC/ASC

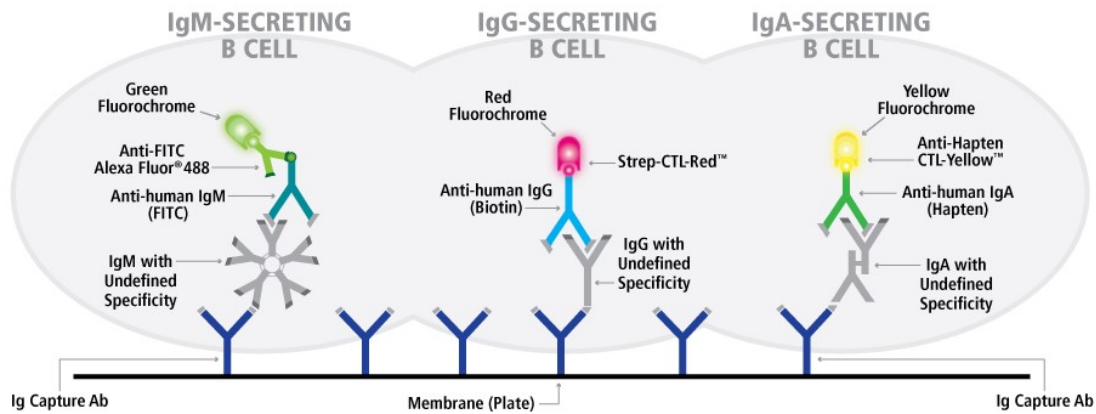


Figura 19: esquema de la tècnica utilitzada per marcar amb fluorescència antigens o anticossos en el sèrum d'un pacient. (Font: <http://www.immunospot.com/immunospot-kits/human-igm-igg-iga-three-color-fluorospot>).

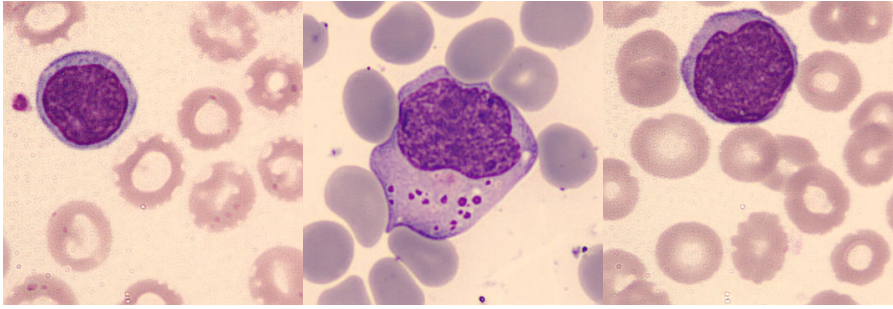
1.3.5. DESCRIPCIÓ DE LES PATOLOGIES INCLOSES EN EL TREBALL

1.3.5.1. LIMFOCITOSI REACTIVA

El fet de trobar més limfòcits del que s'espera en un pacient sa i com he explicat anteriorment s'anomena LIMFOCITOSI.

Les principals causes de trobar més limfòcits del normal solen ser fisiològiques o reactives a malalties que no son greus com refredat comú, grip o gastroenteritis. Sol ser per causa vírica.

Cal però fer un examen microscòpic per saber si la morfologia dels limfòcits que estan en excés és normal o patològica abans de decidir que el pacient no té res greu.



Imatge 10: a l'esquerra imatge d'un limfòcit morfològicament normal; al mig imatge d'un limfòcit reactiu amb grànuls al citoplasma; a la dreta imatge d'un limfòcit discretament reactiu amb una mica més de mida del normal. (Font pròpia)

1.3.5.2. MONONUCLEOSI INFECCIOSA

La mononucleosi infecciosa és una malaltia vírica provocada per un virus de la família dels herpes (VH) anomenat Esptein-Barr (VEB o VH4); també pot ser causat per el virus Herpes 5 o citomegalovirus (CMV).

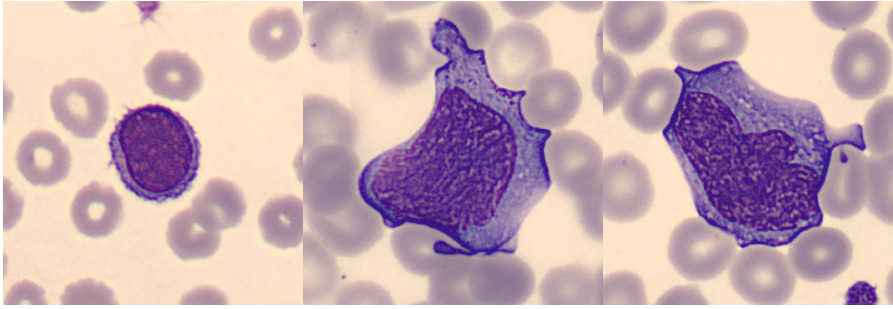
La malaltia es transmet principalment per la saliva, en un contacte directe entre la persona que té la malaltia i la persona que posteriorment l'adquirirà.

Els símptomes es donen quan han passat els 10-15 dies d'incubació i es poden trobar al llarg de 1-2 setmanes. Els seus símptomes més freqüents son febre, mal de gola i inflamació de les angines, mal de panxa i inflamació dels ganglis limfàtics. Aquesta malaltia és més comú trobar-la en l'entorn escolar: adolescents i adults joves.

Els símptomes principals son:

- Febre
- Astènia
- Tumefacció dels ganglis limfàtics
- Lesió hepàtica
- Altres com per exemple rinitis o edema de parpelles

El diagnòstic es realitza per un quadre clínic i per les alteracions en la sang (observació microscòpica dels limfòcits d'aspecte reactiu a la sang perifèrica), que son causades per un augment de leucòcits amb augment dels limfòcits. Per confirmar la malaltia s'utilitzen els estudis serològics que demostren la presència d'anticossos heteròfils.



Imatge 11: a l'esquerra imatge d'un limfòcit morfològicament normal; al mig i a la dreta imatge de dos limfòcits estimulats i de morfologia reactiva d'un pacient amb Mononucleosi infecciosa.

El procediment de laboratori per detectar aquest tipus de malaltia inclou l'hemograma, l'observació al microscopi òptic de les cèl·lules de la sang i la determinació per serologia dels anticossos contra el Virus que causa la malaltia. Cal fer totes les proves per poder informar al pacient de la benignitat de la seva malaltia.

1.3.5.3. LEUCÈMIA LIMFÀTICA CRÒNICA

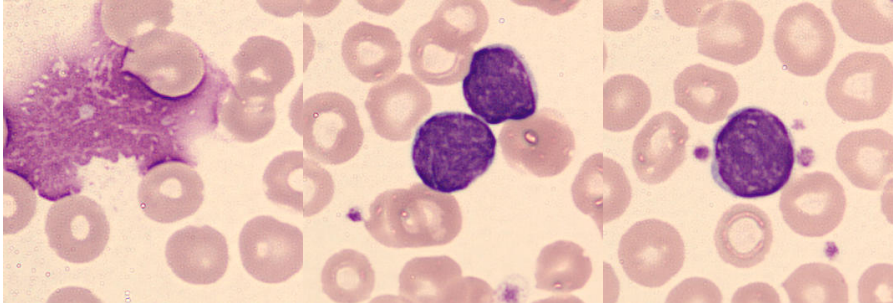
La leucèmia limfàtica crònica (LLC) és un síndrome limfoproliferatiu crònic amb una expressió leucèmica, que vol dir que les cèl·lules que es multipliquen de forma descontrolada es veuen a la sang perifèrica dels malalts.

La LLC és un càncer de la sang, per tant és una malaltia maligna, que consisteix en que la medul·la òssia i els òrgans de l'organisme produeixen una quantitat de Limfòcits B molt elevada, en excés. En una persona sana els limfòcits predominants són els T (amb anticòs principal CD3); seguidament els B (anticòs principal CD19) i finalment els NK (anticòs principal CD56). Els pacients amb LLC tenen un clar predomini de limfòcits B en absència de resposta del sistema immune.

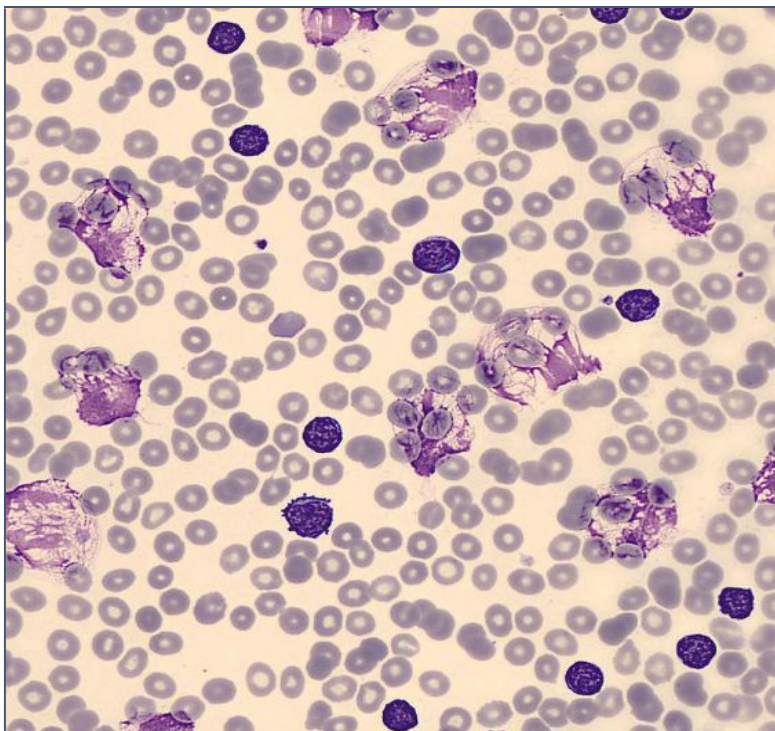
En la LLC, els limfòcits B infiltren la medul·la òssia de manera progressiva els teixits limfàtics i altres òrgans. La conseqüència de la malaltia és la infiltració que desplaça els elements normals de la sang i impedeix el funcionament correcte dels òrgans, per altre banda, els limfòcits no funcionaran correctament i no compliran la seva funció.

En la majoria de casos la LLC es diagnostica mitjançant una analítica rutinària o de forma casual. Es veu limfocitosi a l'hemograma i és en l'anàlisi al microscopi quan es veu la morfologia típica d'aquestes cèl·lules malignes.

Son limfòcits molt més petits que els normals, i tenen un nucli que sembla trencat, que en citologia es diu “quartejat” o “en Grumeleé”. També son molt habituals les ombres cel·lulars que abans he citat (apartat d’anàlisi morfològic de sang perifèrica) i es deu a que aquests limfòcits B es trenquen molt fàcilment.



Imatge 12: imatge a l'esquerra d'una ombra cel·lular; al mig i dreta dos limfòcits de mida petita i nucli quartejat d'un pacient amb LLC. (Font pròpia)



Imatge 13: imatge a petit augment d'un pacient amb LLC, on es veuen moltes ombres cel·lulars i petites cèl·lules corresponent a Limfòcits B típics d'aquesta malaltia.

Cal fer Immunofenotip amb citometria de flux utilitzant anticossos CD19 per poder comprovar que son aquests els limfòcits patològics. En el tractament de una LLC, els primers anys el pacient pot portar una vida normal excepte quan el pacient ha de fer-se els controls obligats per veure si la malaltia segueix igual o ha progressat.

1.4 CONCEPTES ESTADÍSTICS

L'estadística és una ciència relacionada amb les matemàtiques. Es basa en el recull de dades per poder fer anàlisis i interpretar-los. Al laboratori com en molts serveis on es treballa amb dades de pacients, es fa servir per poder treure conclusions d'alguns resultats. Amb l'estadística es poden proposar millores en funció de les conclusions a les que s'arriba.

En el cas de l'hemograma és important conèixer la **corba de distribució normal** o **Campana de Gauss** (figura 20). En aquesta corba la línia que divideix la línia pel mig en dues parts iguals fa referència a una mesura numèrica. Aquesta mesura és la Mitjana de la població inclosa en la corba.

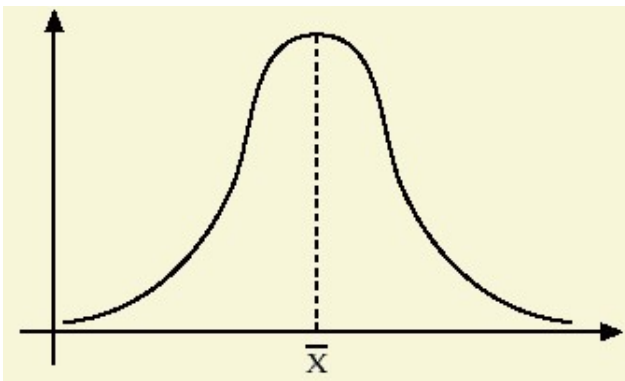


Figura 20: exemple d'una corba de distribució normal o Campana de Gauss; la línia que creua pel mig la corba és la mitjana. (Font: <https://www.hiru.eus/es/matematicas/distribucion-normal>)

A la prova de l'hemograma, podem observar gràfiques que en l'eix de les X tenim el volum de la cèl·lula que estem mesurant, i en l'eix de les Y trobem el nombre de cèl·lules. Aquesta mesura segueix una Distribució normal, la gràfica ens hauria de donar una trajectòria perfecta (que si la partim per la meitat sigui igual als dos costats).

Una altra mesura que podem fer es troba relacionada amb com d'ampla és la corba. Això serà una mesura que s'anomena de Dispersió; correspon a l'amplada de la corba en horitzontal. Dona una idea matemàtica de com d'igual és la mesura que estem analitzant.

Per mesurar la dispersió, del 100% de la gràfica nosaltres només li farem cas a un 95%, ja que el 2,5% del principi i el 2,5% del final no s'utilitzen ja que son resultats molt diferents a la mitjana. Aquesta distribució es pot veure a la figura 21.

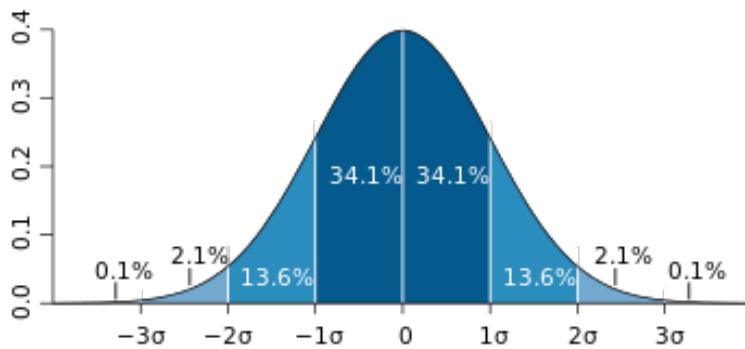


Figura 21: exemple d'una corba de distribució normal o Campana de Gauss; la mesura en horitzontal inclou pràcticament el 95% de tots els resultats mesurats i n'exclou els valors extrems (a l'esquerra els més baixos i a la dreta els més alts).

En aquest treball faré servir aquestes dues mesures matemàtiques:

- La mitjana d'una població cel·lular (en concret la mitjana del volum cel·lular dels limfòcits)
- L'ample de la corba per la població de limfòcits o Distribució dels limfòcits (ample de distribució normal limfocitària)

Per avaluar i comparar dades entre grups, es pot utilitzar un gràfic anomenat **Diagrama de caixes i bigotis**, representat a la figura 22. A la figura 23 es pot veure què significa aquesta caixa, amb la línia mitja corresponent a la mediana de la mesura i els bigotis que mostren les diferències entre les mostres analitzades en un mateix grup.

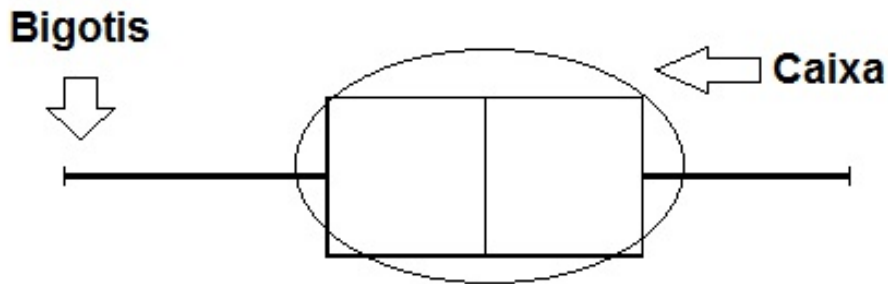


Figura 22: diagrama de caixes i bigotis. A la caixa trobem els valors inclosos entre els percentils 25% i 75% de la mesura analitzada; la línia de la caixa fa referència a la mitjana. Els bigotis fan referència a les dades mínimes i màximes. (Font: <https://6esopromosadako1997.wordpress.com/2013/03/09/classe-del-dimecres-632013diagrama-de-caixa-i-bigotis/>)

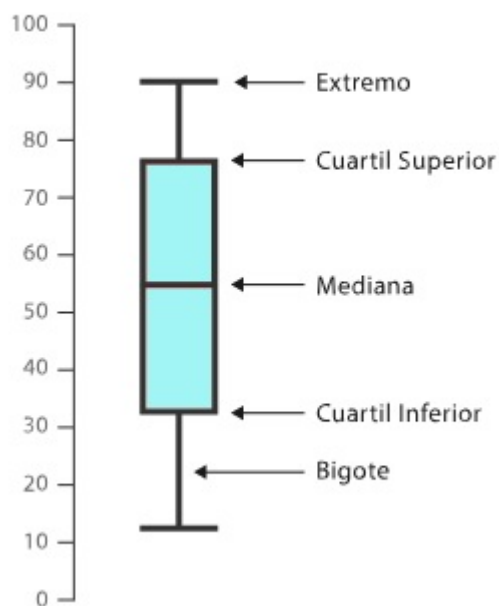


Figura 23: descripció detallada del diagrama de caixes i bigotis. Podem veure la mitjana (enmig de la caixa), els percentils o quartils (entre el 25% i el 75%). Als extrems els bigotis. Si hi ha algun valor fora dels percentils quedaria fora del diagrama (en forma de punt). (Font: <https://es.justexw.com/como-hacer-el-grafico-de-caja-y-bigotes-con-versiones-antiguas-de-excel.html/diagrama-de-caja-ejemplo-2>)

MARC METODOLÒGIC

2. METODOLOGIA (MATERIAL I MÈTODE)

Durant aquest procés explicaré el material i el mètode per dur a terme totes les proves que incloc al meu treball dut a terme amb la supervisió dels professionals d'Hematologia Dra. Anna Marull i Tècnic de laboratori Sra. Maite Quintana, durant el mes de Juliol del 2019 a l'àrea d'Hematologia de l'hospital Santa Caterina de Girona. He adjuntat diverses fotos que les he fet jo mateix durant el procés que no estan numerades per facilitar la lectura ja que en el procés ja estan explicades.

2.1. RECEPCIÓ I PROCESSAMENT DE LES MOSTRES.



RECEPCIÓ DE MOSTRES: les mostres dels pacients que es punxen a l'hospital i al centre d'atenció primària arriben al laboratori al llarg del matí. Un cop arriba a la recepció, es distribueixen segons el tipus de mostra obtinguda entre les diferents àrees del laboratori clínic on cada persona encarregada de cada àrea anirà recollint les mostres apropiades a mesura que aquestes vagin arribant. Com que el meu treball està enfocat en l'àrea de hematologia treballaré amb la sang dels diferents pacients que han estat sotmesos a una analítica rutinària o de control.

COMPROVACIÓ DE LES MOSTRES: una de les funcions que es fa a la recepció de mostres és comprovar que es correspongui el tub amb la petició del pacient. Un cop cada àrea tingui les seves mostres, ens hem d'assegurar que aquestes estiguin en un bon estat, que hi hagi una quantitat de mostra suficient per poder-les processar i que hagin arribat en les condicions adequades (etiqueta, petició, proves demanades).

PREPARACIÓ DE L'ANALITZADOR: abans de poder dur a terme qualsevol prova amb analitzadors, ens hem d'assegurar que aquest ja estigui preparat per funcionar correctament. Per preparar un analitzador hem de fer passar per ell algunes mostres

de prova les quals ja sabem quin és el resultat que s'ha d'obtenir per veure si el analitzador està funcionant correctament. Aquestes proves es diuen Control de Qualitat; comprovem que el resultat dona segons l'esperat i l'analitzador estarà a punt per treballar. En el cas que doni un resultat erroni s'hauria d'analitzar i detectar l'error de l'analitzador o tornar a preparar una altra mostra de control.

Un altre aspecte que s'ha de tenir en compte abans de començar a fer servir l'analitzador és que aquest estigui net per dins i que no tingui residus del dia anterior, per això cada dia es fan cicles de neteja tots els conductes per on passen les mostres reals. També farà falta veure si els reactius que consumeix cada analitzador son correctes ja que si en mig del dia es queda sense reactius alentiria molt la feina; en el cas que hi hagi absència d'algun reactiu s'haurà de substituir per un de nou.

Un cop tenim totes les proves fetes i tot correcte podem procedir a començar a passar mostres reals per obtenir els primers resultats.

PROCESSAR LES MOSTRES: depenent de l'analitzador que es vulgui fer servir per obtenir diferents resultats les mostres hauran d'estar sotmeses a una preparació prèvia o no. Hi ha mostres que abans de ser introduïdes al analitzador han de ser barrejats amb certs reactius per tal de garantir-ne el funcionament. Per exemple, el citòmetre de flux FC500 Beckman Coulter, necessita que la mostra de sang sigui barrejada amb l'anticòs monoclonal corresponent a les proves que volem fer.

Hi ha determinacions que no necessiten que les mostres s'hagin de preparar i per tant es poden introduir a l'analitzador sense fer res més. Per exemple l'hemograma, que un cop ens arriben les mostres a la recepció del laboratori i les hem classificat correctament es poden introduir a l'analitzador sense que sigui necessari una preparació de les mostres.

VERIFICAR EL RESULTAT: quan la mostra que hem introduït prèviament a l'analitzador surt, aquest ens dona uns resultats que seran examinats i observats pel professional encarregat de la prova (metges i facultatius de laboratori) per així poder arribar a una conclusió del diagnòstic final del pacient o bé per tenir una idea aproximada del que té el pacient que ens pot conduir a dur a terme unes proves específiques addicionals per així arribar al diagnòstic final del pacient.

2.2. TIPUS DE MOSTRA AL LABORATORI

A la recepció del laboratori clínic poden arribar 5 tipus de mostra de sang que es podran distingir pel color del tap del tub on està la mostra, els colors son: blau clar, vermell, groc, verd i lila. El color varia en funció de les substàncies anticoagulants per poder analitzar les mostres (Exemple: EDTA o Àcid etilendiaminotetracètic ($C_{10}H_{16}N_2O_8$))

- Blau clar: tub de coagulació amb citrat sòdic, que para la cadena de la coagulació i així poder mesurar els factors
- Vermell: tub sec sense activador de coagulació; té separador de gel
- Groc: tub amb gel separador de sèrum i activadors de coagulació
- Verd: tub de heparina liti, anticoagulant, amb o sense gel separador (plasma)
- Lila: tub amb EDTA o Àcid etilendiaminotetracètic ($C_{10}H_{16}N_2O_8$); anticoagulant per deixar els elements cel·lulars en suspensió.



Imatge 14: Fotografies dels diferents tubs del laboratori clínic. (Font Pròpia)

També ens podríem trobar altres colors que corresponen a tubs amb altres additius, aquests colors son: Blanc, Groc clar, Lila clar i Taronja.

- Blanc: tub que conté Fluorur/EDTA o Iodocatet
- Groc clar: tub que conté ACD
- Lila clar: tub que conté EDTA/Aprotinina
- Taronja: tub que conté Trombina

Aquests tubs son molt poc habituals i es fan servir només per fer proves molt específiques.

2.3. PROCESSAMENT DE LES MOSTRES A HEMATOLOGIA



HEMOGRAMA: una vegada les mostres surten de la recepció i ja està comprovat que tot sigui correcte, la primera prova que farem és l'hemograma. Si el tub no està correcte, es rebutja (exemple, mostra coagulada, mostra insuficient). Depenent dels resultats que veiem a l'hemograma es farà una extensió de sang en un portaobjectes per mirar-la al microscopi òptic i valorar-ne la morfologia. Això seria la Citologia de sang perifèrica.

CITOLOGIA: és el pas del laboratori on s'avalua la morfologia de les cèl·lules al microscopi òptic. Al laboratori hi ha moltes mostres a analitzar cada dia; per aquest motiu disposen d'un microscopi adaptat a un digitalitzador d'imatges que s'anomena CellaVision DM96. El CellaVision és una màquina amb un microscopi intern digital que ens dona com a resultat la morfologia cel·lular del pacient, per tant, una idea més aproximada de la malaltia que pot arribar a tenir el pacient. Amb això s'analitzen més de 200 cèl·lules de cada pacient de forma més ràpida i poden compartir les imatges amb els companys (de vegades cal comentar els pacients per decidir que és millor).

El microscopi intern farà fotos de totes les cèl·lules que es troba i segons el sistema les classificarà segons el que l'ordinador creu que son tenint en compte la forma, mida i aspecte d'aquesta. Com que no sempre l'ordinador les classifica correctament, la classificació arriba als ordinadors d'uns professionals en hematologia que redistribuiran aquelles cèl·lules que creuen que no pertanyen al seu grup, de manera que faran variar els resultats una mica per tenir un resultat final molt més precís. Aquesta prova pot diagnosticar sense necessitat de més proves la limfocitosi reactiva ja que a l'observar els limfòcits ens pot dir si aquests son reactius o no. En el possible cas que es tracti d'una LLC procedirem a la següent prova anomenada cistometria de flux específica.

CITOMETRIA DE FLUX ESPECÍFICA: en aquesta prova posterior a l'estudi de la citologia es pot diagnosticar si el pacient té una malaltia cancerosa de la sang o bé és alguna malaltia més benigna com la mononucleosi. De totes les proves que he citat aquesta és la més específica per què es fan servir marcadors monoclonals (anticossos) de la membrana de les cèl·lules que volem analitzar (exemple: marcador CD19 per saber si son limfòcits B).

POSSIBLES PROVES ADDICIONALS: hi ha malalties que amb les 3 proves anteriors encara no les podem diagnosticar de manera segura, però si que podem tenir moltes hipòtesis. La que he treballat jo és la mononucleosi infecciosa, que per diagnosticar-la cal fer algunes proves addicionals que les proposaran els professionals en hematologia a través dels resultats obtinguts en l'hemograma, l'estudi de la citologia i l'estudi de la citometria. Aquestes proves son les Serologies per Virus de la família Herpes (virus Epstein-Barr i/o Citomegalovirus). Amb això podem diagnosticar de manera segura una Mononucleosi en la mostra del pacient que ens ha arribat.

Ara explicaré amb més detall cadascun dels passos metodològics: Hemograma, Citologia i citometria de Flux.

2.3.1 HEMOGRAMA

Material necessari:

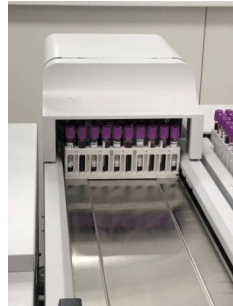
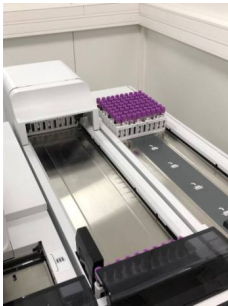
- Tubs amb mostra del pacient
- Analitzadors
- Reactius de l'analitzador
- Arxivador
- Gestor de dades

Procediment per fer un Hemograma: primer de tot cal reunir tots els tubs que necessiten hemograma i posar-los en *racks* (gradetes de 10 tubs) per introduïu-los a la màquina tots en grup i anar-los posant a mesura que ens arribin noves mostres (prèviament s'han revisat un a un).



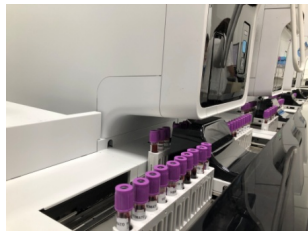
Posem les gradetes de mostres a l'entrada dels analitzadors (que poden estar individuals o disposats en cadena, per poder fer moltes mostres en poc temps). Cada vegada que tenim un carret amb mostres que cal passar-les les anem introduint a la cadena i poc a poc aniran entrant, la cadena emmagatzema tots els carrets amb mostres i els posa en espera fins que arribi el seu torn.

Per cada gradeta de mostres, l'aparell n'escaneja el codi de barres per saber amb quin

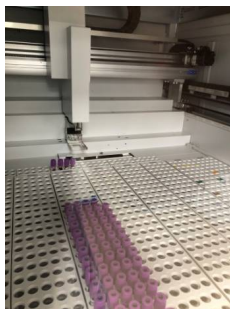


tub està treballant, si fa falta que se li realitzi l'hemograma, si calen altres proves extres o si es pot arxivar. Cada pacient es troba codificat amb un número que consta a tots els tubs que s'han extret, i que és amb el que es treballa al laboratori.

Una vegada escanejades totes les mostres, passen per una cinta transportadora fins



arribar a una de les 5 màquines que formen part de la cadena on seran analitzades una per una. Posteriorment la màquina mostrarà els resultats en una pantalla interna de l'analitzador; els mateixos resultats es mostren en els punts de treball dels facultatius de l'àrea, zona de treball on es decideix que cal fer en cada cas.



Per últim, un cop ja estan fetes totes les proves la gradeta amb les mostres segueix per la cinta fins arribar a un arxivador automàtic, que arxivarà totes les mostres depenent si se li ha de fer alguna prova addicional, si ja no fa falta cap més prova o si tenen alguna determinació més concreta que cal fer. D'aquesta manera els treballadors podran saber on és el tub que necessiten entrant a la base de dades i anant a buscar-lo a l'arxivador.

Els tubs que s'arxivem tenen una posició individual que lliga el número de petició amb les dades del pacient (nom i cognoms, edat...); si cal afegir alguna determinació o comprovar algun resultat, la posició de tots els tubs es pot consultar en una base de

dades que dura 24 hores. Passat aquest temps la sang ja no és útil per analitzar-la i per tant es pot llençar. Cada dia es fa el mateix procediment amb les mostres del dia.

Cada analitzador processarà els tubs que li arriben fent servir la tecnologia explicada al marc teòric. Per això fan falta reactius líquids (diluent, lisant...) i marcadors fluorescents (fluorocroms no específics). Els analitzadors que fan hemograma pinten les diferents cèl·lules d'un mateix color i les separen per tamanys i tipus de citoplasma.



2.3.2. CITOLOGIA

Material necessari:

- Portaobjectes
- Colorants i reactius per la tinció
- Microscopi o digitalitzador d'imatges
- Gestor de dades

Als laboratoris petits les extensions es realitzen de forma manual per que tenen menys mostres diàries. A la figura 24 podem veure com es fa una extensió de sang perifèrica de forma manual.

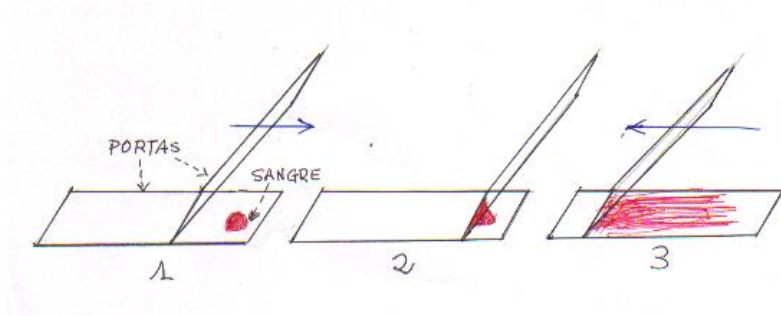


Figura 24: procés que s'ha de dur a terme per fer una extensió d'una mostra (Font: <http://lolabh.blogspot.com/2012/01/estudio-de-un-frotis-de-sangre.html>)

Al laboratori clínic de Santa Caterina fan més de 2000 hemogrames cada dia i per tant és necessari fer les extensions de forma automàtica; per això tenen un extensor-tenyidor que es troba juntament amb la cadena. En funció dels resultats que la màquina veu a l'hemograma i seguint unes regles que els metges programen, fa l'extensió de sang i ja la dona tenyida (imatge inferior, extensor tenyidor).



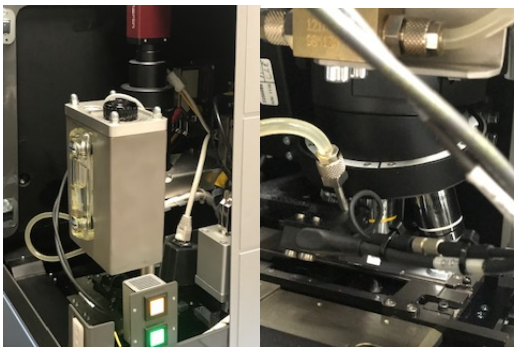
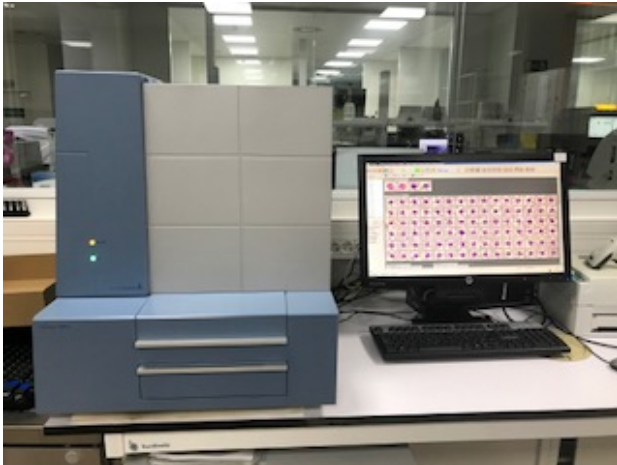
Primerament, hem de comprovar els resultats que ens ha donat l'hemograma per saber si es necessari fer la citologia o no, en cas afirmatiu comença en procés d'aquesta prova.



Agafem el tub amb la sang i n'extraiem una mostra petita per posar a un portaobjectes que ens servirà per posar-ho a dins el CellaVision. Tenim la mostra amb un colorant anomenat MGG (May Grunwald Giemsa) i ho deixem eixugar.

Aquesta tinció combina dos colorants: May Grunwald, que tenyeix les substàncies citoplasmàtiques atzuròfiles de les cèl·lules de color blau i les eosinòfiles de color vermell i Giemsa, que tenyeix la cromatina i els grànuls cel·lulars de color blau.

Al CellaVision es poden analitzar 12 extensions en aproximadament 30 minuts; de cada mostra se n'obtenen 220 imatges que es poden veure totes juntes o de forma individual.



Aquestes mostres s'analitzen a diferents augments (50 augments i 100 augments utilitzant oli immersió).

Un cop ho introduïm al CellaVision (digitalitzador d'imatges amb un microscopi intern), aquest fa fotografies i les envia al PC dels treballadors especialitzats en hematologia, que observaran els resultats, donaran un diagnòstic si es possible i diran si fa falta alguna altre prova.

2.3.3 CITOMETRIA DE FLUX ESPECÍFICA

Material necessari per fer citometria de flux específica:

- El tub amb la mostra del pacient corresponent
- Tubs de plàstic petits
- Retolador permanent

- Pipeta capaç de mesurar 100 landes
- Pipeta capaç de mesurar de 5 a 10 landes
- Puntetes de pipeta adients a la pipeta que fem servir
- Diferents tipus d'anticossos monoclonals
- Un barrejador automàtic
- La màquina que hemolitza les mostres anomenada TQ-Prep
- El citòmetre de flux acompanyat d'un PC amb un monitor
- Una impressora

La citometria de flux amb anticossos monoclonals és una tècnica molt específica que només es fa per determinades proves (exemple, saber si un pacient es pren bé la medicació per la infecció pel virus immunodeficiència humana) o bé en casos on amb la citologia es pensa o sospita que el pacient pot tenir un càncer de la sang.

El citòmetre de flux fa servir la mateixa tecnologia que he explicat en el marc teòric; a diferència de l'analitzador de l'hemograma (un sol color per diferents cèl·lules) aquí fem servir més d'un color (anticossos monoclonals amb fluorocroms) per un tipus de cèl·lula concret (la que volem estudiar).

Per exemple, si volem saber si el pacient té els limfòcits que toca amb la proporció que és normal, posarem diferents colors (pels diferents tipus de limfòcits) però només mirarem limfòcits, no la resta de leucòcits.



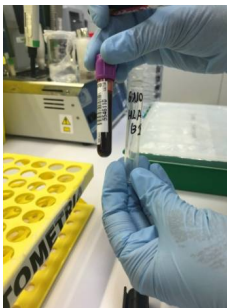
El primer que hem de fer al voler fer proves amb el citòmetre és fer *primes* que consisteixen en fer passar uns líquids per tots els tubs del citòmetre per netejar-los de les mostres del dia anterior perquè no hi hagi residus, continuadament s'han de fer una sèrie de controls diaris amb 4 líquids diferents els quals l'ordinador ja sap el resultat que ha de donar; així ens assegurem que la màquina funciona correctament.

Aquests 4 líquids son: Aigua destil·lada, *Flow-Check* (5 gotes de *Flow-Check 770 fluorospheres* i 10 gotes de *Flow-Check fluorospheres*), *Flow-Set* (5 gotes de *Flow-Check*

fluorosferes i 10 gotes de Flow-Check 770 fluorosferes), i *Inmunotrol* (una sang amb uns valors ja coneguts d'un monoclonal específic per).

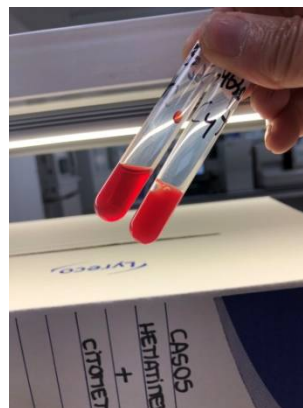
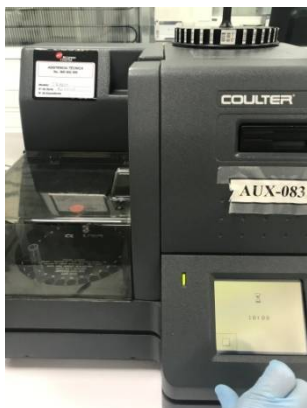


Primer de tot necessitem que ens arribin les mostres que necessiten ser sotmeses a una citometria de flux específica després de que passin per la prova de l'hemograma i de la citologia.



Un cop tinguem la mostra corresponent, hem de agafar un tub de plàstic i amb un retolador escriure el numero corresponent al pacient i el tipus de monoclonal que hem afegit.

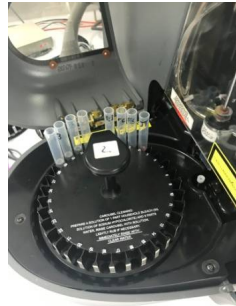
Disposem de molts tipus d'anticossos monoclonals, cadascun corresponent a una proteïna diferent de la cèl·lula (de citoplasma, de nucli o de membrana). Cada anticòs porta enganxat un color fluorescent que farà llum quan passi pel làser del citòmetre. Podem utilitzar més d'un anticòs alhora sempre que portin colors diferents. Abans de poder fer servir els anticossos però, cal hemolitzar les mostres (trenquem els eritròcits per què al citòmetre només volem veure els leucòcits).



Un cop tenim la mostra preparada (amb l'agent lisant) i barrejada l'hem d'introduir 10 minuts al TQ-Prep perquè la mostra s'hemolitzi i estigui preparada completament per ser analitzada pel citòmetre de flux. L'anticòs no es pot afegir fins que estigui ben hemolitzada. La fotografia de la dreta (pàgina anterior) és d'una mostra abans d'hemolitzar una mostra i després de que hagi estat hemolitzada. Com podem observar, l'hemolitzada és més transparent i deixa passar més la llum que la no hemolitzada que és més translúcida.

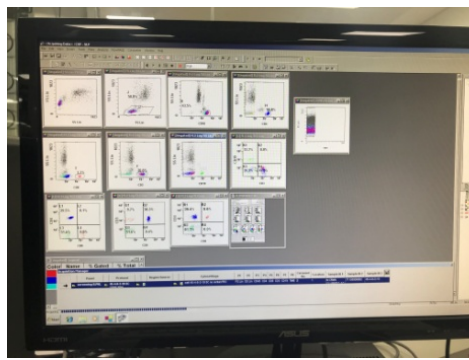
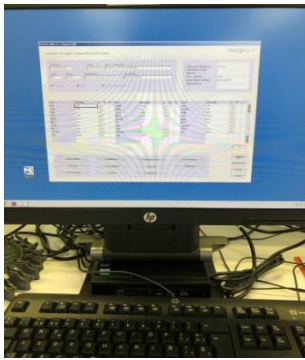
Ara ja podem afegir l'anticòs o anticossos monoclonals que ens facin falta per fer el marcatge cel·lular. Un cop tinguem la mostra preparada amb el seu monoclonal corresponent ja està casi llesta per dur a terme la prova.

És important abans de introduir la mostra a qualsevol màquina barrejar-la correctament per garantir que la mostra de sang i el monoclonal s'han unit



perfectament de manera proporcional, per això utilitzarem un barrejador automàtic. Un cop han passat 10 minuts la mostra està preparada per poder-la analitzar. Fotografia del carret de mostres del citòmetre.

Les mostres s'analitzen de forma individual, obtenint diferents gràfiques en funció del tipus de cèl·lula que hem analitzat i dels colors que volem veure. Cada gràfica combina dos colors (eixos X i Y); podem tenir tantes gràfiques com combinacions de dos colors proporcionem a la mostra. Cada citòmetre pot analitzar diferent número de colors en funció del número de làser de què disposa. En el nostre cas podem analitzar 5 colors al mateix temps (3 làsers: un vermell, un verd i un blau).



Un cop la prova s'ha dut a terme, entrem els resultats a la base de dades per publicar els resultats de totes les proves que s'han fet.

Al següent esquema es pot veure com els anticossos marcats fluorescent s'uneixen a les cèl·lules que volem analitzar. Aquesta unió cèl·lula-anticòs fluorescent és la que emetrà llum que el làser veurà i ens mostrarà en forma de gràfica.

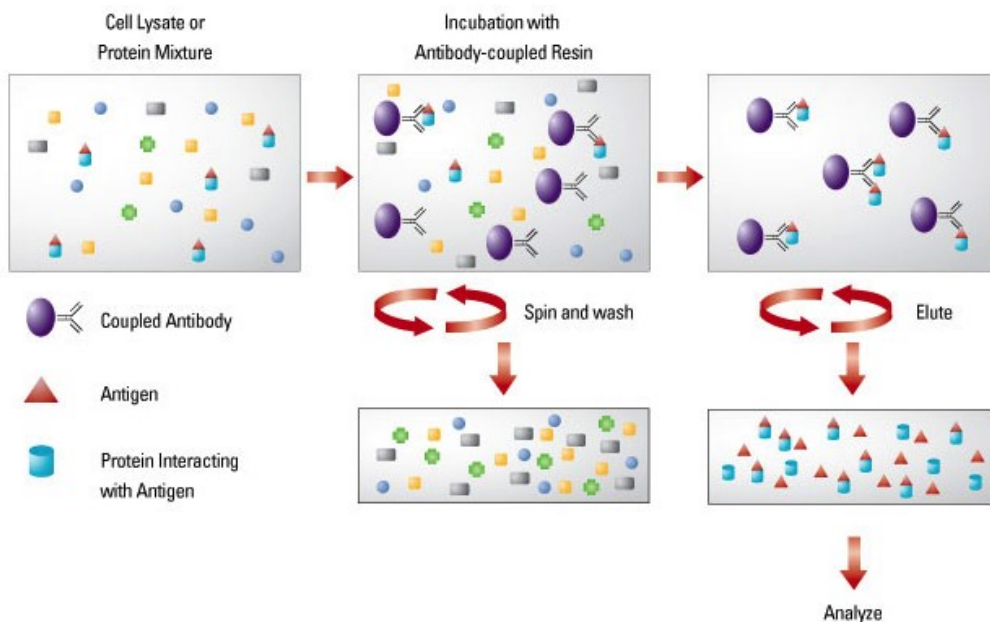


Figura 25: esquema que representa el funcionament dels anticossos fluorescents (Font: <http://www.labome.es/method/Antibody-Applications.html>).

A la figura 25 podem observar com es marca de forma fluorescent la proteïna de les cèl·lules que volem saber si es troba present en el sèrum o la sang d'un pacient en qui es sospita malaltia.

2.4 PAQUET ESTADÍSTIC

Per l'anàlisi estadístic de les dades, hem fet servir el paquet estadístic anomenat SPSS o bé *Statistical Package for the Social Sciences*.

Hem analitzat dades de pacients amb limfocitosi per treure'n diferents resultats:

- Mitjana, percentils de pacients amb limfocitosis (diagrama de caixes i bigotis)
- Dispersió del volum de la població limfocitària (corba de distribució normal).

CAL RECORDAR A NIVELL METODOLÒGIC:

• AL LABORATORI ES TREBALLA SEGUINT UN ORDRE DE PROVES; CADA PACIENT POT NECESSITAR COSES DIFERENTS PARTINT D'UN MATEIX PUNT.

• FEM SERVIR DIFERENTS TECNOLOGIES EN FUNCÍO DEL QUE ESTEM BUSCANT. LES TECNOLOGIES MÉS ESPECÍFIQUES ES FAN SERVIR EN MENYS OCASIONS QUE LES MÉS GENERALS.

• CAL SEGUIR ELS PROTOCOLS PER CADA TÈCNICA O PROCEDIMENT; TOTS ELS PASSOS SON IMPORTANTS I SI NO ELS SEGUIM PODEM COMETRE ERRORS MOLT GREUS PEL PACIENT.

MARC PRÀCTIC

3. MARC PRÀCTIC

3.1 RESUM DE L'ESTUDI FET AL MARC PRÀCTIC

En el marc pràctic del meu treball de recerca hi consten tres parts:

1. La limfocitosi al laboratori; quan es revisa, com es fa i quin objectiu tenim quan ho fem. Resultats amb una sèrie de pacients.
2. Estudi detallat dels resultats de 3 pacients amb limfocitosi i l'avaluació de l'algoritme utilitzat al laboratori pel diagnòstic d'aquesta condició.
3. Anàlisi estadístic d'un nou paràmetre de la població limfocitària a l'hemograma.

OBJECTIUS:

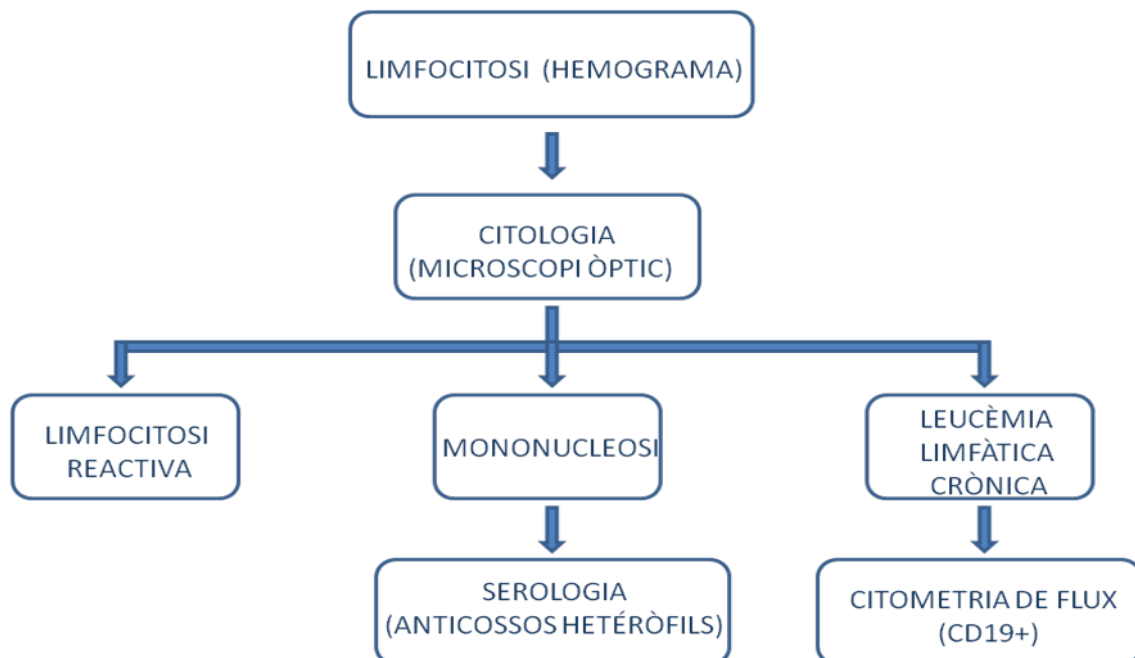
- Saber distingir un pacient sa d'un pacient amb limfocitosi (valorar els paràmetres de l'hemograma especialment els dels leucòcits).
- Saber arribar seguint tots els passos que es fan al laboratori al diagnòstic que de les 3 malalties principals estudiades entre tots els pacients observats.
- Saber aplicar totes les metodologies descrites al marc teòric en els casos en què veig alteracions de l'hemograma. Extreure conclusions amb els resultats que em doni la part pràctica i verificar les meves conclusions.
- Validar el funcionament de totes les tècniques utilitzades al laboratori i verificar la seva eficàcia.
- Aprendre a manejar l'Excel (Microsoft Office) i d'altres programes del laboratori per dur a terme gràfiques i creuar dades així com fer-ne un anàlisi estadístic senzill (amb ajuda dels facultatius del laboratori).
- Conèixer bé com funciona un procés al laboratori clínic per arribar al diagnòstic d'un pacient.

3. 2 PART PRÀCTICA

3.2.1. LA LIMFOCITOSI AL LABORATORI. CRITERI DE REVISIÓ DEL PACIENT

La limfocitosi és una de les alteracions quantitatives més freqüents al laboratori. Com ja hem citat en el marc teòric, la limfocitosi és una alteració en el número de limfòcits a l'organisme del pacient, concretament quan en trobem en excés. Al laboratori es considera limfocitosi absoluta (quan contem cèl·lules en total) a partir de 5.000 limfòcits/ μ L. Pot ser també relativa, l'absoluta és un augment global de limfòcits i en la relativa augmenta el percentatge respecte les altres cèl·lules (exemple, quan un pacient té més % de limfòcits que de neutròfils que en condicions normals son els més abundants).

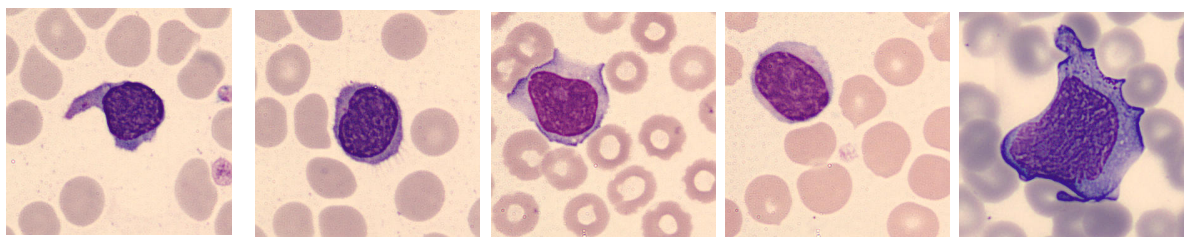
Per diagnosticar-la hem de fer un anàlisi de sang que serà processat fins arribar al diagnòstic. Farem servir l'hemograma, la citologia i la citometria de flux específica. Aquí presento un esquema de l'algoritme que es segueix al laboratori a l'hora d'avaluar els resultats d'una limfocitosi (esquema inferior, font pròpia).



Proposo aquest esquema on, com podem veure, quan detectem una limfocitosi a l'hemograma fem sempre un anàlisi microscòpic. En aquesta prova es mira sobretot la forma i la mida dels limfòcits; si son normals seran de mida petita i sense cap cosa de la seva forma que ens cridi l'atenció.

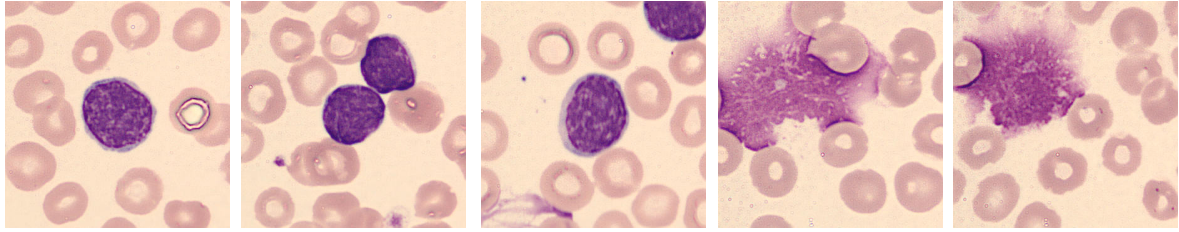
Si veiem que els limfòcits son reactius (una mica més grans del normal amb més citoplasma) i el pacient no té res mes, no cal fer res. Es demana que es controli. Cal dir que en tots els casos els facultatius del laboratori miren i llegeixen la història clínica del pacient per poder valorar el que es veu al microscopi. Amb tota aquesta informació es decideix que no cal afegir ni fer res mes.

Si veiem limfòcits molt i molt grans, amb alguna altra alteració als anàlisis que poden indicar una infecció vírica, afegim serologia per descartar o confirmar una mononucleosi infecciosa.



Imatge 14: d'esquerra a dreta, els dos primers son limfòcits normals, els dos del mig son limfòcits reactius però no caldria fer cap tractament al pacient i l'últim correspon a una infecció vírica o mononucleosi (molt més grans). (font pròpia)

Finalment, si a la citologia veiem que limfòcits son molt petits i en trobem de trencats, fent el que s'anomena ombra cel·lular, podem pensar en un procés cancerós, com la leucèmia limfàtica crònica (LLC). En aquests casos i com he dit en el marc teòric i metodològic, cal fer citometria de flux específica.



Imatge 15: imatges de limfòcits d'un pacient amb una LLC; son petits i tenen la cromatina trencada. També és característic veure ombres cel·lulars.

Per tant en funció del que es veu al microscopi es decideix quines proves fem als pacients i així arribar a un diagnòstic. D'aquesta manera s'accelera el tractament i es millora per tant el pronòstic dels pacients.

Vaig recollir durant una jornada sencera (18 de juliol de 2019) les limfocitosis que apareixien en pacients no coneguts (no havien tingut mai una limfocitosi). En tots ells es va fer servir aquest esquema, per tant, varem fer citologia en tots ells i si calia, citometria o serologia, sempre en funció de l'anàlisi al microscopi.

Per fer-ho, vaig contar el nombre de tubs que van passar pels aparells d'hematimetria durant una jornada i el resultat va ser de 1425 tubs; d'aquests, 88 tenien alguna alteració a la sèrie leucocitària (no es van incloure alteracions de l'hemoglobina ni de les plaquetes). D'aquests 88, 20 tenien limfocitosi absoluta i/o relativa.

Això ens fa arribar als resultats següents: del 100% de mostres, el 6,17% tenien alguna anomalia leucocitària i treballant sobre aquest 100%, un 1,4% tenia limfocitosi. Si treballem però sobre les 88 mostres que tenen alguna anomalia, el 17,6% tenen limfocitosi. Aquests resultats son molt similars als observats anteriorment al laboratori clínic.

En la següent taula es troben descrites les dades dels 20 casos que varen presentar limfocitosi. A la taula LEU → Número de leucòcits / μ L (HGB → Hemoglobina; LIM N → Número de limfòcits/ μ L; PLT → Número de plaquetes/ μ L i LIM % → Percentatge de limfòcits.

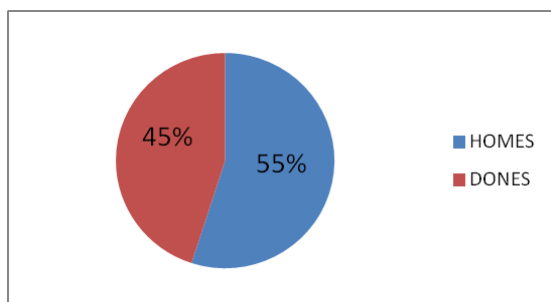
Aquests 20 casos que vaig analitzar al laboratori, van estar seleccionats totalment a l'atzar a mesura que anaven sortint els resultats dels seus respectius hemogrames. Amb els resultats obtinguts a l'hemograma vaig analitzar les dades corresponents a la xifra total de leucòcits i limfòcits tenint en compte l'edat i el gènere de tots els pacients. Vaig recollir totes les dades en una taula per poder fer un anàlisi de les dades del grup de pacients seleccionats amb limfocitosi.

Totes aquestes dades estan recollides en la taula 3, on consta l'edat i el gènere dels pacients que he estudiat així com les dades de l'hemograma analitzades.

	GÈNERE	EDAT	LEU	LIM N	LIM %	HGB (g/dL)	PLT
CAS 1	M	49	11.510	5.600	48,7	15,7	258.000
CAS 2	F	20	9.390	5.340	56,9	13,5	251.000
CAS 3	F	22	10.870	6.170	56,8	14,8	318.000
CAS 4	M	65	9.390	6.400	68,2	15,3	126.000
CAS 5	M	46	13.190	7.350	55,7	14,3	230.000
CAS 6	F	62	11.600	8.940	77,1	13,4	208.000
CAS 7	F	72	13.610	8.610	63,3	9,8	297.000
CAS 8	M	72	11.760	5.820	49,5	14,1	243.000
CAS 9	M	83	6.900	5.760	83,5	9,5	256.000
CAS 10	M	48	11.510	5.600	48,7	15,7	258.000
CAS 11	F	70	10.720	5.300	49,4	13,6	240.000
CAS 12	F	14	8.460	5.510	65,1	12,0	303.000
CAS 13	F	85	86.200	77.920	90,4	9,7	496.000
CAS 14	F	71	12.260	9.930	56,5	13,8	174.000
CAS 15	M	61	11.440	5.090	44,5	16,0	306.000
CAS 16	M	79	14.870	10.140	68,2	13,5	229.000
CAS 17	F	5	14.100	8.370	59,4	12,8	354.000
CAS 18	M	53	9.320	5.620	60,3	14,5	152.000
CAS 19	M	64	10.650	5.400	50,7	15,7	207.000
CAS 20	M	85	31.360	26.270	83,8	9,0	163.000

Taula 3: En aquesta taula podem veure la recopilació de resultats dels 20 pacients amb limfocitosi estudiats al laboratori en un dia sencer de feina.

Els primers resultats que vaig calcular son els referits al gènere (home o dona) del grup de pacients estudiat. Vaig observar que el 45% eren dones i el 55% eren homes, com es pot veure al gràfic 1.



Gràfic 1: distribució per gènere de les 20 mostres estudiades del laboratori que van presentar limfocitosi

El següent anàlisi del grup de pacients que vaig fer, és de la xifra de leucòcits. Dels 20 pacients, 7 tenen més de 12.000/ μ L per tant, leucocitosi. Això vol dir que un 35% dels pacients estudiats tenien més leucòcits del normal.

Respecte la limfocitosi, dels 20 pacients, el 100% tenien limfocitosi absoluta perquè és el criteri de revisió al laboratori. D'aquests, 9 presentaven limfocitosi relativa i absoluta, és a dir, un 45% del total dels pacients estudiats.

Respecte l'edat i el diagnòstic final de cada cas, vaig analitzar la possible relació de l'edat amb el tipus de malaltia. Vaig fer aquest estudi perquè mentre feia la taula em vaig fixar que els pacients eren o bé grans o bé petits, i em semblava que pocs pacients tenien edats intermitjies (ni joves ni grans). Aquests resultats es mostren a la taula 4.

	Limfocitosi Reactiva			Leucèmia Limfàtica Crònica			Mononucleosi Infecciosa		
	Mitjana	25%	75%	Mitjana	25%	75%	Mitjana	25%	75%
EDAT	48,9	47,0	61,0	74,4	70,0	83,0	13,7	5,0	22,0
LEU	11001,4	9390,0	11510,0	20867,0	10720,0	14870,0	11143,3	8460,0	14100,0
LIM N	5714,3	5340,0	5620,0	16509,0	5820,0	10140,0	6683,3	5510,0	8370,0

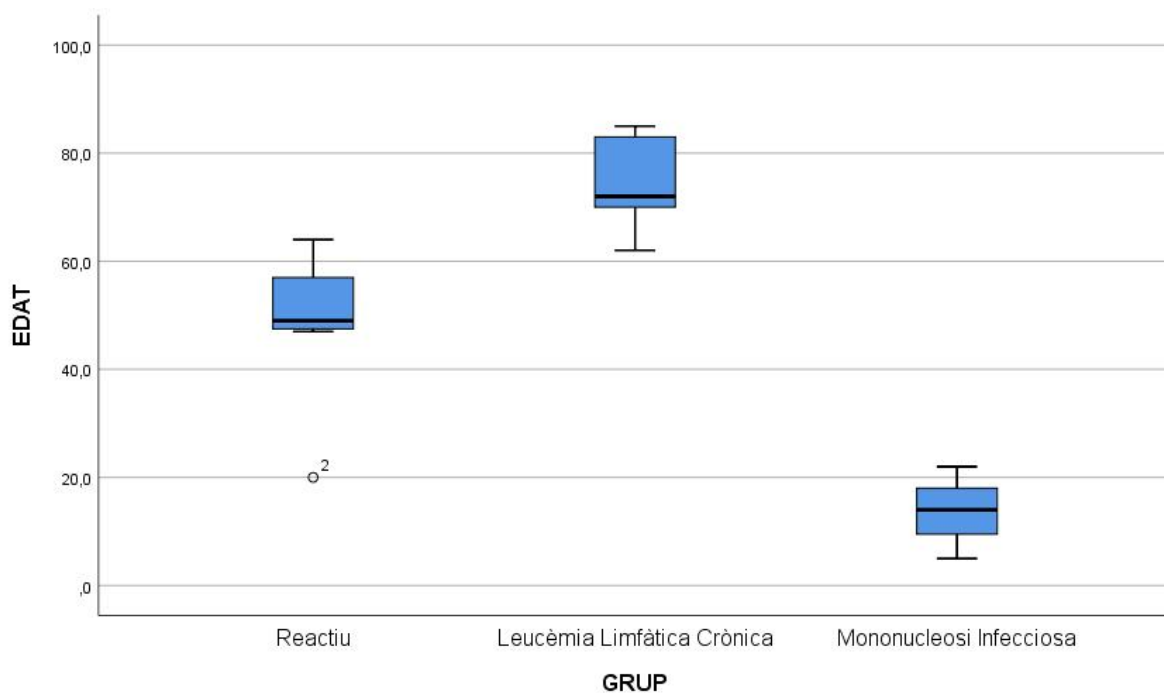
Taula 4: Taula dels resultats que relacionen la malaltia del pacient amb l'edat.

La taula 4 recull la informació dels pacients dividits en tres grups: els que es troben en la mitjana d'edat per cada grup de malaltia (exemple, la mitjana d'edat de la mononucleosi és de 13.7 anys), els pacients que es troben propers al 25% del grup d'edat en relació a la mitjana (exemple, un 25% de pacients que tenen LLC tenen 74.4 anys) i el percentil 75 del grup (exemple, un 75% de pacients amb limfocitosi reactiva tenen 61 anys).

També es pot observar que en el cas d'una limfocitosi reactiva, la mitjana d'edat és variable, normalment entorn als 47-61 anys segons el percentil 25 i 75 del grup estudiat (mitjana de 48.9 anys). En el cas de una LLC, és molt més freqüent en persones d'avançada edat entorn als 70-83 anys segons el percentil 25 i 75 del grup estudiat (mitjana de 74,4 anys). En el cas de les mononucleosis infeccioses, els pacients més observats són joves d'una edat que pot anar de 5-22 anys segons el percentil 25 i 75 del grup estudiat (mitjana de 13,7 anys).

Amb l'ajuda dels facultatius del laboratori, vaig fer una representació amb un diagrama de caixes i bigotis dels resultats d'aquests 20 pacients. Varem proposar al programa estadístic la gràfica de la relació entre edat i grup de malaltia. De forma més visual, veiem a l'eix de les X l'edat i al de les Y el grup patològic (malaltia).

A primera vista ja es pot veure com el grup del mig de la gràfica (pacients amb LLC) es veu molt més amunt respecte l'eix de les X (vol dir que tenien més edat que la resta) mentre que el grup que es veu més baix és el de mononucleosi infecciosa (molt més freqüent en nens i adolescents). El grup de pacients amb limfocitosi reactiva es troba enmig pel que fa l'edat (no són ni molt grans ni molt joves). Aquests resultats es poden veure al gràfic 2 de caixes i bigotis dels tres grups de patologia que han sortit dels 20 pacients estudiats.



Gràfic 2: resultat de l'anàlisi estadístic amb diagrama de caixes on es relaciona edat amb grup patològic. Reactiu es refereix a una Limfocitosi Reactiva. Podem veure com els pacients amb LLC tenen molta més edat que els pacients amb mononucleosi infecciosa. Els resultats són significatius, és a dir que les diferències observades entre grups són reals. Gràfica obtinguda utilitzant el programa SPSS.

3.2.2. PACIENTS INDIVIDUALS DE LES TRES CONDICIONS PATOLÒGIQUES ESTUDIADES.

D'aquests 20 pacients que vaig estudiar en el primer punt de la part pràctica, en vaig seleccionar 3 (un amb cada tipus de malaltia amb les que he treballat). He entrat més en detall en cadascun d'ells seguint també el primer esquema de la part pràctica (primer hemograma, després citologia i proves complementaries si fa falta).

Durant la meua part pràctica al laboratori em vaig fixar sobretot en com una mateixa condició, la limfocitosi, pot tenir diferents diagnòstics. N'he triat 3 que corresponguin a les malalties que he treballat (limfocitosi reactiva, Mononucleosi infecciosa i Leucèmia Limfàtica Crònica) per poder trobar similituds i diferències en els seus resultats a

l'hemograma i mitjançant les fotos de les cèl·lules que hem obtingut fent la citologia poder donar un diagnòstic final.

De cada pacient estudiat, he adjuntat una taula amb els resultats que ens dona l'hemograma, una imatge del gràfic de dispersió dels leucòcits, el sexe, l'edat i l'alarma que ens dona l'hemograma a l'analitzar la sang del pacient corresponent.

Vaig observar tots els resultats i vaig observar el gràfic de dispersió de cadascun d'ells. En el cas de la Mononucleosi Infecciosa vaig mirar la citologia de la sang i posteriorment la serologia, i en el cas de la LLC vaig mirar la citologia de la sang i la citometria de flux específica.

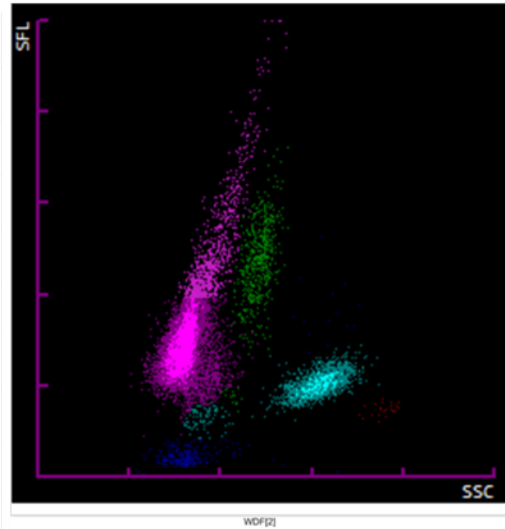
A cada cas destacaré el sexe i l'edat; també les alteracions tan quantitatives com qualitatives; els primers símptomes que es noten abans d'anar a l'hospital, els valors que ens ha donat l'hemograma (números de les diferents cèl·lules i els percentatges), la dispersió que ens ha donat i les alarmes de l'hemograma.

PACIENT NÚMERO 1

Dona de 62 anys que va anar a l'hospital per mal estar general i presència de febre des de feia uns dies. Un cop arribada a l'hospital el metge decideix fer una analítica. No té cap antecedent de malaltia greu; no té cap al·lèrgia a medicaments. Està aparentment sana.

A l'hemograma podem observar que no té un nombre superior a 12.000 leucòcits/ μL , per tant estan normals (dins dels valors esperats per un pacient sa), l'hemoglobina també és normal, però podem observar una alteració quantitativa dels limfòcits ja que té 8.940 limfòcits/ μL . Podem dir que té una limfocitosi relativa i absoluta, ja que el percentatge de limfòcits és superior al 60%. L'hemograma dona l'alarma de limfòcits anormals detectats a la sang del pacient. També podem observar una alteració qualitativa ja que al gràfic de distribució podem observar un núvol rosat que se'n va de la trajectòria que seria normal i s'estira molt cap amunt.

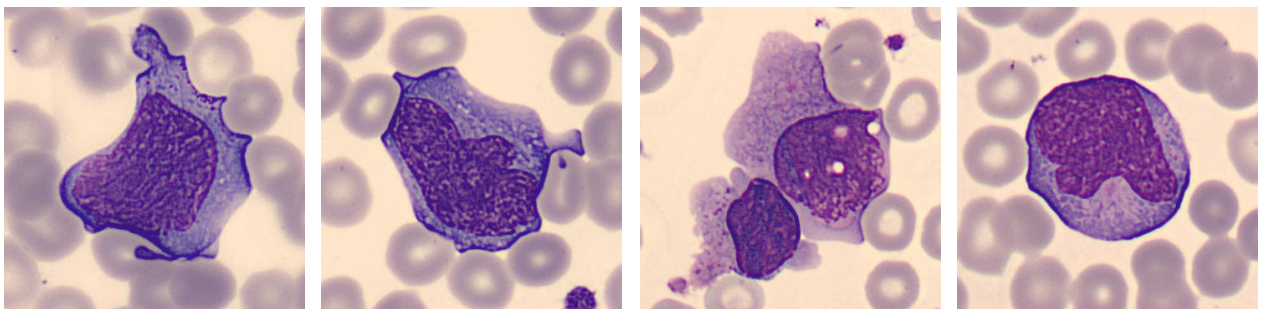
MAGNITUD	RESULTAT	UNITATS
LEUCÒCITS	11.60	10 ³ /μL
ERITRÒCITS	4.68	10 ⁶ /μL
HEMOGLOBINA	13.4	g/dL
VCM	92.3	fL
HCM	28.6	Pg
CHCM	31.0	g/dL
PLAQUETES	208	10 ³ /μL
NEUTRÒFILS	1.93	10 ³ /μL
LIMFÒCITS	8.94	10 ³ /μL
MONÒCITS	0.60	10 ³ /μL
EOSINÒFILS	0.03	10 ³ /μL
BASÒFILS	0.10	10 ³ /μL
NEUTRÒFILS %	16.5	%
LIMFÒCITS %	77.1	%
MONÒCITS %	5.2	%
EOSINÒFILS %	0.3	%
BASÒFILS %	0.9	%



62 anys; febre i mal estar general

LIMFOCITOSIS
ALARMA Abn Lympho

A la citologia s'observen cèl·lules de gran mida, molt blaves i d'aspecte molt reactiu. No es veuen limfòcits de mida petita.



Imatge 16: imatges de limfòcits corresponents al pacient número 1; son molt grans i de color molt blau. Son típics de mononucleosi infecciosa.

Després de detectar aquestes cèl·lules al microscopi i repassant els símptomes que van dur la pacient a urgències (febre i es troba malament), es pensa en una infecció vírica. Es va demanar la serologia per detectar anticossos heteròfils contra els virus de la família Herpes. El resultat va ser positiu per Virus Herpes 5 o Citomegalovirus. El diagnòstic final va ser el de Mononucleosi Infecciosa.

Quan un virus entra al nostre cos genera la formació d'anticossos com a mecanisme de defensa. En el cas dels virus de la família Herpes això es produeix en 5-7 dies després del contacte del pacient amb el virus. Si volem saber si el pacient està infectat o no, com que no podem detectar el virus directament, detectem els anticossos contra el virus.

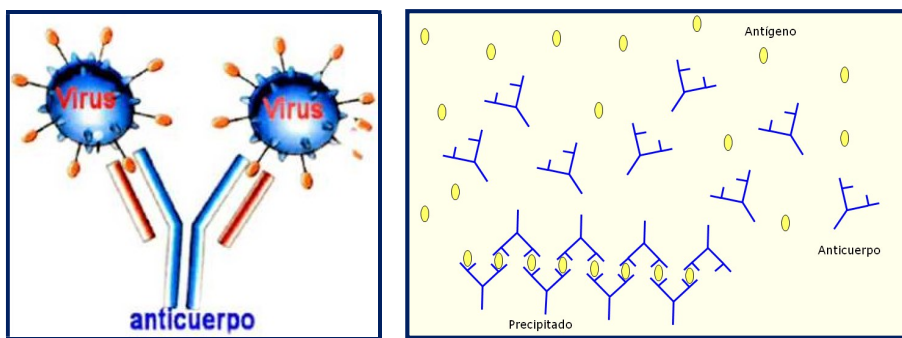


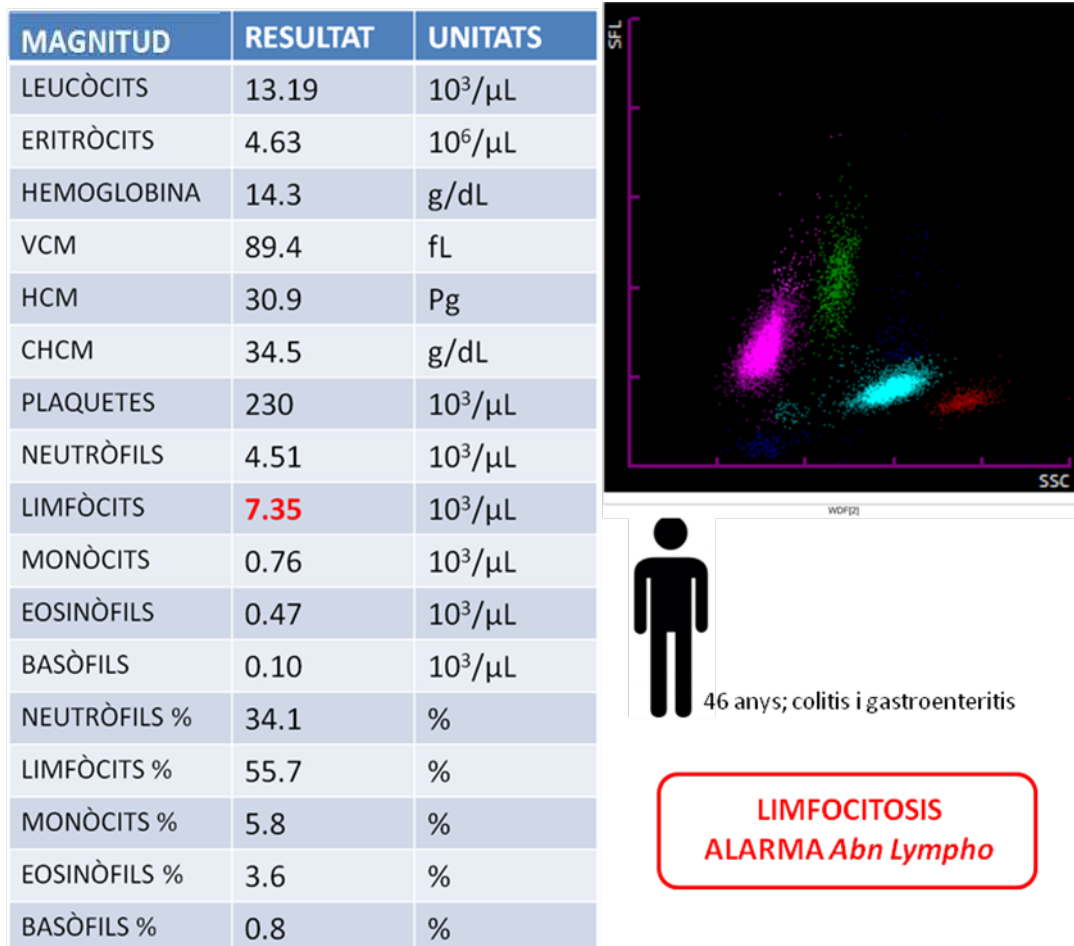
Figura 26: a l'esquerra, resposta del cos fabricant anticossos contra un virus A la dreta, esquema de com podem saber si una mostra d'un pacient té anticossos produïts per una infecció vírica. Si el pacient ha generat anticossos contra el virus que busquem, en presència d'aquest antígen conegut (el posem nosaltres al laboratori), s'uniran antígen-anticòs i precipitarà (aspecte com amb grumolls).

A la figura 26 podem observar com un anticòs present en el sèrum d'un pacient es pot unir per afinitat a un antígen que posem al laboratori marcat amb color fluorescent per poder veure amb llum aquesta unió.

PACIENT NÚMERO 2

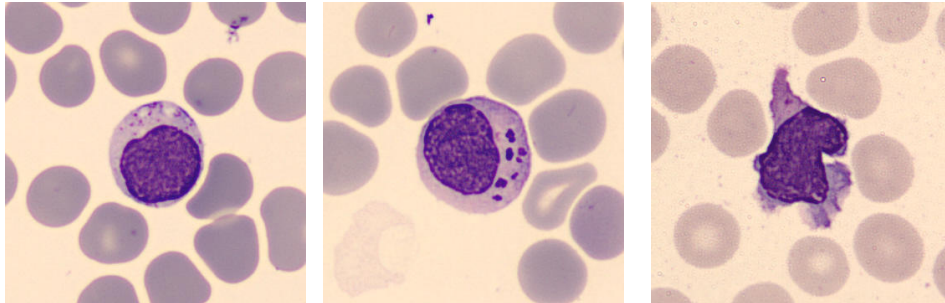
Home de 46 anys que va anar a al seu metge de primària per gastroenteritis i aquest li diu que s'ha de fer una analítica.

Passem la mostra per l'analitzador i veiem que el número de leucòcits és lleugerament elevat ja que el màxim per no tenir alarmes és 12.000 leucòcits/ μL ; també veiem que l'hemoglobina la té normal. Té una alteració quantitativa, una limfocitosi absoluta, però no relativa ja que té 7.350 limfòcits/ μL però no més d'un 60% de limfòcits respecte les altres cèl·lules. La prova ens dona l'alarma de limfòcits anormals detectats a la sang del pacient. L'aspecte del gràfic de dispersió no crida massa l'atenció.



A la citologia veurem limfòcits amb una mica més de citoplasma del conte, alguns amb grànuls al citoplasma i la majoria de mida i forma normals.

Com el que pacient té una gastroenteritis que normalment és per virus no greus que poden ser de moltes famílies, no es sol afegir cap prova més. És doncs una Limfocitosi reactiva. Es recomana repòs relatiu i control pel seu metge en dues setmanes.



Imatge 17: imatges de limfòcits corresponents a una limfocitosi reactiva. Podem veure a la del mig grànuls al citoplasma.

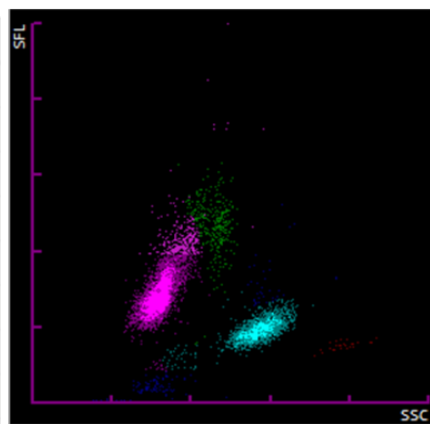
PACIENT NÚMERO 3

Home de 65 anys que va anar al seu metge de primària per colitis i gastroenteritis; el seu doctor decideix que el millor és fer una analítica.

Un cop feta la analítica va ser sotmesa a la prova de l'hemograma que com podem observar té un nombre normal de leucòcits. L'hemoglobina està tocant el límit superior (per sobre de 16 gr/dL ja seria alta) però la considerem normal. Té una alteració quantitativa, una limfocitosi absoluta i també relativa ja que té 6.400 limfòcits/ μ L i supera el 60% del total de cèl·lules leucocitàries.

També té una alteració qualitativa ja que com podem veure en el gràfic de distribució, el núvol rosa i el núvol verd estan en contacte, i el rosa està lleugerament estirat cap amunt. Per últim, la prova ens dona l'alarma de limfòcits anormals detectats a la sang del pacient.

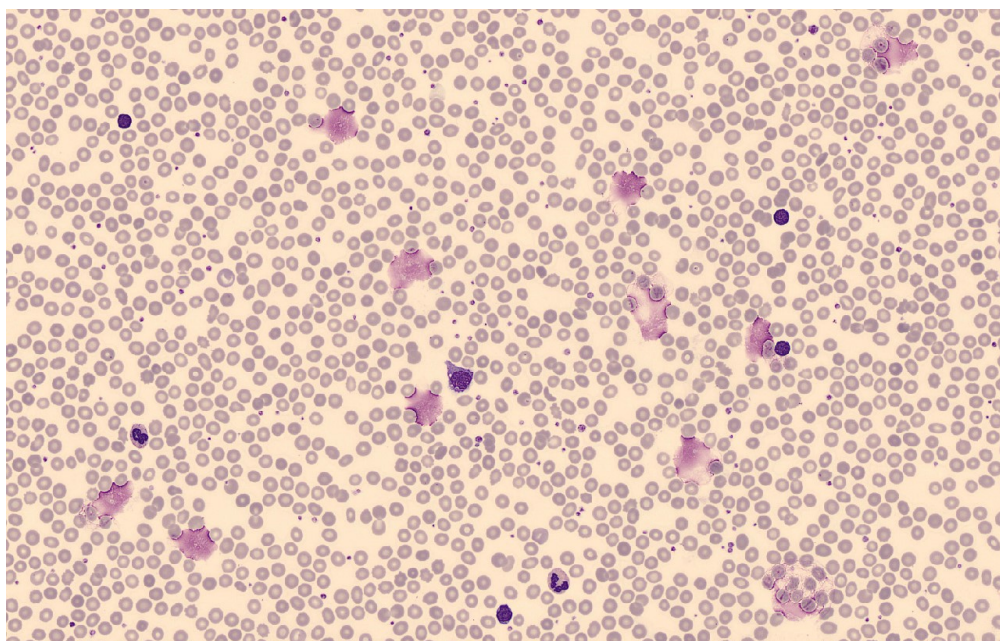
MAGNITUD	RESULTAT	UNITATS
LEUCÒCITS	9.39	10 ³ /μL
ERITRÒCITS	5.03	10 ⁶ /μL
HEMOGLOBINA	15.3	g/dL
VCM	96.4	fL
HCM	30.4	Pg
CHCM	31.5	g/dL
PLAQUETES	126	10 ³ /μL
NEUTRÒFILS	2.58	10 ³ /μL
LIMFÒCITS	6.40	10 ³ /μL
MONÒCITS	0.35	10 ³ /μL
EOSINÒFILS	0.03	10 ³ /μL
BASÒFILS	0.03	10 ³ /μL
NEUTRÒFILS %	27.5	%
LIMFÒCITS %	68.2	%
MONÒCITS %	3.7	%
EOSINÒFILS %	0.3	%
BASÒFILS %	0.3	%



65 anys; colitis i gastroenteritis

LIMFOCITOSIS
ALARMA Abn Lympho

A la citologia vam poder observar que els limfòcits eren més petits del normal i vam detectar ombres que es corresponen a limfòcits més fràgils que es trenquen quan fem l'extensió.



Imatge 18: Imatges de limfòcits corresponents a una LLC (puntets de color blau fosc). Podem veure limfòcits molt petits i ombres per tota la foto. Es una imatge molt típica d'aquest tipus de malaltia.

La citologia ens indica que aquest pacient no té cap procés ni reactiu ni infecció; pot ser un procés tumoral o cancerigen. Haurem de procedir a fer la prova de la citometria de flux específica, amb l'ús d'anticossos monoclonals dirigits contra la membrana dels limfòcits.

Com he dit anteriorment, en un pacient sa els limfòcits més abundants són els tipus T (marquen positiu per l'anticòs monoclonal anomenat CD3); seguidament tenim els limfòcits B (marquen positiu per l'anticòs monoclonal anomenat CD19) i finalment els limfòcits *Natural Killer* o NK (marquen positiu per l'anticòs monoclonal CD56). Cal afegir que TOTS els leucòcits, i per tant tots els limfòcits marquen positiu per l'anticòs monoclonal CD45.

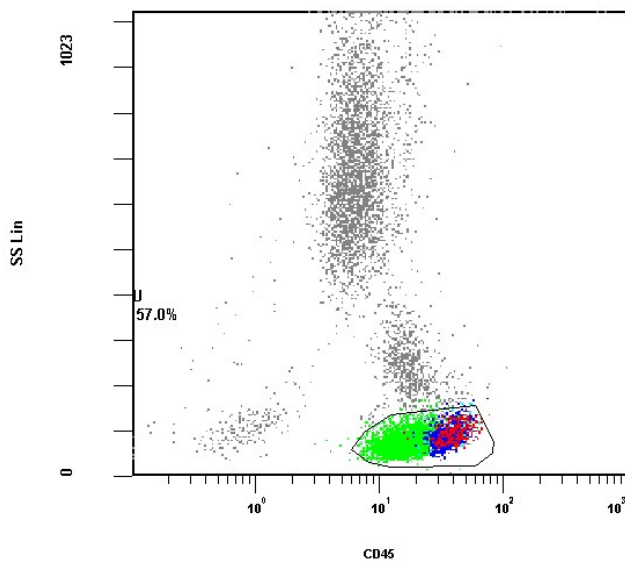
A més els limfòcits T es poden diferenciar entre ells amb dos marcadors: el CD8 i el CD4 (amb això podem diferenciar si són limfòcits T activats contra infeccions o bé són de defensa contra les infeccions).

Amb la citometria obtindrem gràfiques i percentatges que ens indicaran les quantitats de CD19 i el CD3 (suma de CD4 i CD8), sempre considerant que tots han de ser positius per CD45 (marcador de leucòcits).

Quan es comença l'anàlisi de la mostra per citometria específica primer cal assegurar que l'hem processada seguint tots els passos que he explicat al marc metodològic i que l'aparell es troba en perfectes condicions. Això en aquest tipus de prova és molt important per què estem decidint si el pacient té un càncer de la sang o bé és alguna altra cosa no maligna.

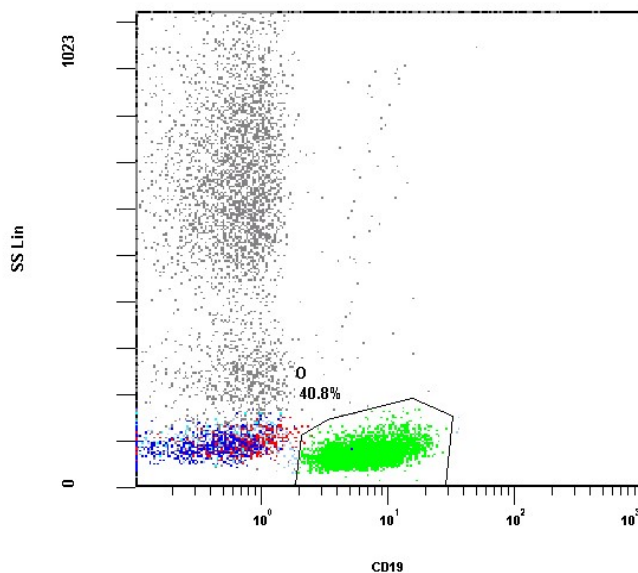
Quan es treballa amb citometria es veuen les cèl·lules que marquen positiu per un anticòs d'un determinat color; a la selecció d'aquest tipus de "núvol de color" l'anomenem "*gating* o selecció d'una gate cel·lular".

Primer pas: seleccionar la població de leucòcits (positiu en verd per CD45, eix X). A l'eix de les Y hi trobem la mida de les cèl·lules. Podem veure-ho al gràfic 3, on el núvol de colors és la població que és positiva a CD45, per tant leucòcits.



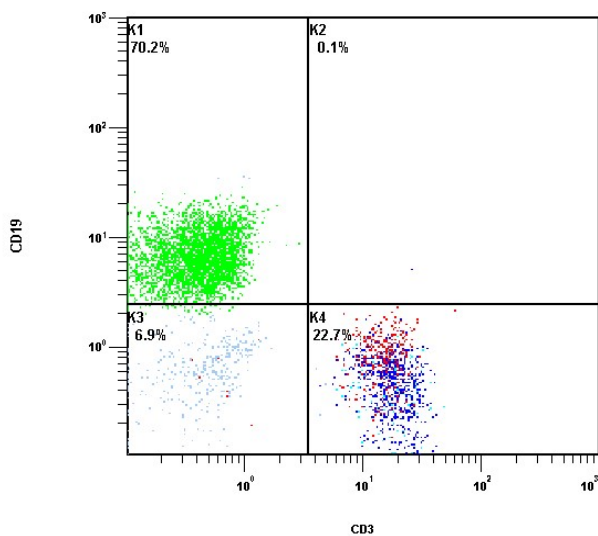
Gràfic 3 : resultat que ens dona el citòmetre de flux on podem veure la població i el percentatge del CD45. Seleccionem la població de CD45 (leucòcits) i deixem fora les plaquetes i els eritròcits. Podem observar que tenim un 57,0% de CD45.

Segon pas: seleccionar la població que marca positiu per CD19 (eix X); a l'eix de les Y hi trobem la mida de les cèl·lules. Es selecciona de tota la població que fa llum (colors blau, vermell i verd) i per tant, limfòcits per que no hem usat cap més marcador cel·lular. La població verda del gràfic 4 es correspon als limfòcits CD19, per tant, B.



Gràfic 4: Resultat que ens dona el citòmetre de flux on podem veure la població i el percentatge del CD19. Hem seleccionat la població de CD19 (Limfòcits B); la quantitat considerada anormal és a partir del 15%, com que té un 40,8% podem dir que té una patologia.

Tercer pas: seleccionar només la població cel·lular que fa llum de color (limfòcits B i T) i contrastar aquests diferents colors posant a l'eix de les X el marcatge positiu a CD3 (limfòcits T) i a l'eix de les Y el marcatge positiu a CD19 (limfòcits B). Aquest pas es troba representat al gràfic 5.



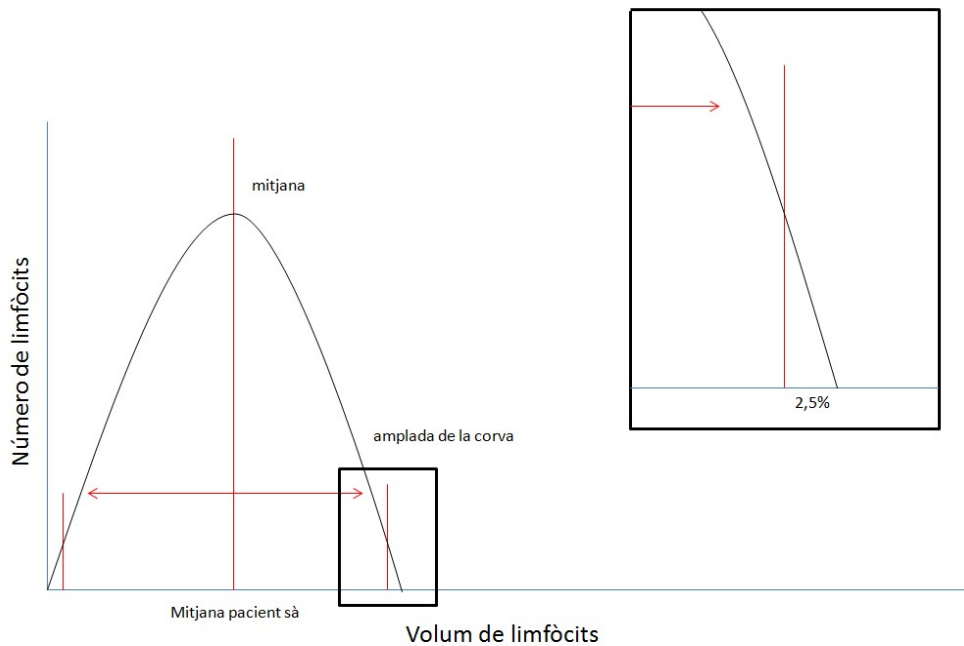
Gràfic 5: Resultat que ens dona el citòmetre de flux on ens compara les poblacions i percentatges de CD3 i CD19. En aquesta gràfica contrastem el CD19 (Limfòcits B) amb el CD3 (Limfòcits T). Com que veiem que el CD19 predomina amb un 70,2% sobre el CD3 que té un 22,7% podem dir que té una malaltia neoplàsica de limfòcits B.

El quart pas ja no el descriu perquè no el vaig dur a terme jo mateix i no el vaig veure (les proves específiques es fan al Laboratori Hematologia Especial de l'Hospital Josep Trueta); seria acabar d'afegir tots els marcadors que són típics de la malaltia sospitada o LLC i fer el contrast dels diferents colors també per citometria de flux. Aquest pas el van fer els facultatius especialistes del laboratori amb el diagnòstic final de LLC. He adjuntat una petita taula dels marcadors que fan que s'arribi a aquest diagnòstic (font: <https://es.slideshare.net/drguillenvargas/leucemias-mas-comunes-en-adultos>)

3.2.3 ANÀLISIS ESTADÍSTIC D'UN NOU PARÀMETRE DE LA POBLACIÓ LIMFOCITÀRIA A L'HEMOGRAMA.

Després de fer la comparació de la limfocitosi com a única dada dels pacients per arribar a diferents diagnòstics, els facultatius del laboratori em van proposar fer una petita prova amb un número que l'analitzador dona en tots els hemogrames però que no es fa servir de forma rutinària. Es un dels paràmetres que es troben en investigació actualment i s'anomena Volum de la població limfocitària.

El Volum de la població limfocitària (VPL) és un número que s'obté d'analitzar tots els limfòcits del pacient amb una corba de normalitat (descrita en el marc teòric). He fet un esquema gràfic del que vol dir aquest número.

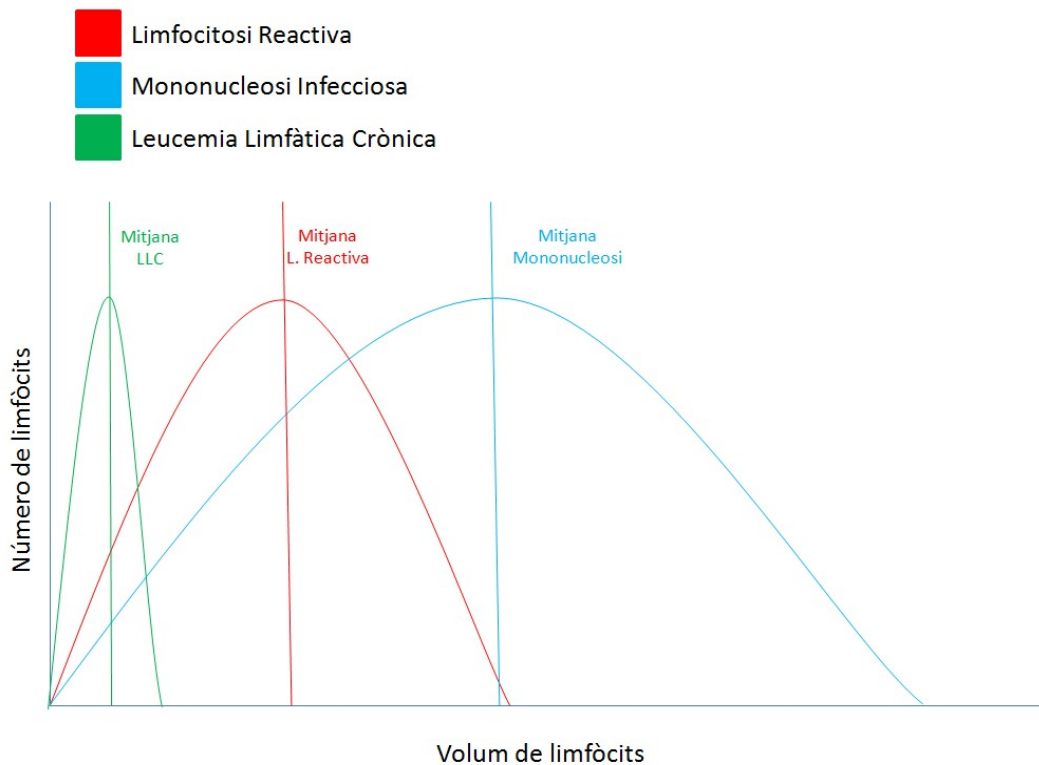


La línia vermella que divideix la corba (població dels limfòcits) per la meitat fa referència a la mitjana del volum de les cèl·lules (eix de les X volum o mida, eix de les Y quantitat de cèl·lules mesurades). Els extrems es rebutgen per que és on trobem els valors més diferents a la mitjana (tant per l'esquerra per que son massa petits com per la dreta per que son massa grans).

L'amplada de la corba dona informació sobre com de diferents són les cèl·lules entre elles (la distància que hi ha entre la més petita a l'esquerra de la gràfica i la més gran a la dreta de la gràfica).

Quan més baixa és aquesta diferència, més petita és l'amplada de la corba i per tant més estreta és. Això vol dir que totes les cèl·lules són molt semblants de mida.

Seguint aquest esquema vaig fer una hipòtesi basada en la mida dels limfòcits de cada malaltia estudiada quan es miren al microscopi. Així, el pacient sa té mida normal, el pacient amb LLC té una mida petita i el pacient amb mononucleosi té una mida gran. Per tant ha d'existir relació amb el número obtingut amb el Volum de la població limfocitària. Posant aquesta hipòtesi en un esquema seria així:



Considerant la limfocitosi reactiva com la gràfica que no és malaltia, la LLC seria més petita del normal i la Mononucleosi seria més gran del normal. A més, la corba de la LLC seria estreta (tots serien molt petits o igual de petits), la de la Limfocitosi Reactiva seria més normal (ni estreta ni ampla) i la de la mononucleosi seria una corba ampla (vol dir que hi hauria cèl·lules molt grans barrejades amb més petites). Ara s'ha de comprovar.

Vaig agafar una mostra de 10 pacients, i totes les dades que l'hemograma va treure les varem col·locar en un full Excel, on posteriorment les varem traslladar al programa que fan servir els facultatius del laboratori anomenat SPSS. En aquest programa varem posar el volum de limfòcits de pacients sans (limfocitosis reactiva), pacients amb una LLC i pacients amb una mononucleosi infecciosa.

En la següent taula podem veure la comparació dels números obtinguts, utilitzant la mitjana i els percentils 25% i 75%. Com podem veure, el volum de la població limfocitària en la limfocitosis reactiva és de 89 femtolitres (fL), just enmig dels 83 fL de la LLC i els 86 fL de la mononucleosi. Si mirem per cada malaltia els percentils usats, veiem que en la limfocitosis reactiva i la LLC els dos valors no són molt distants, és a dir, que la diferència entre el valor petit (percentil 25%) i el valor gran (percentil 75%) no és molt gran. Aquests resultats es troben resumits a la taula 5.

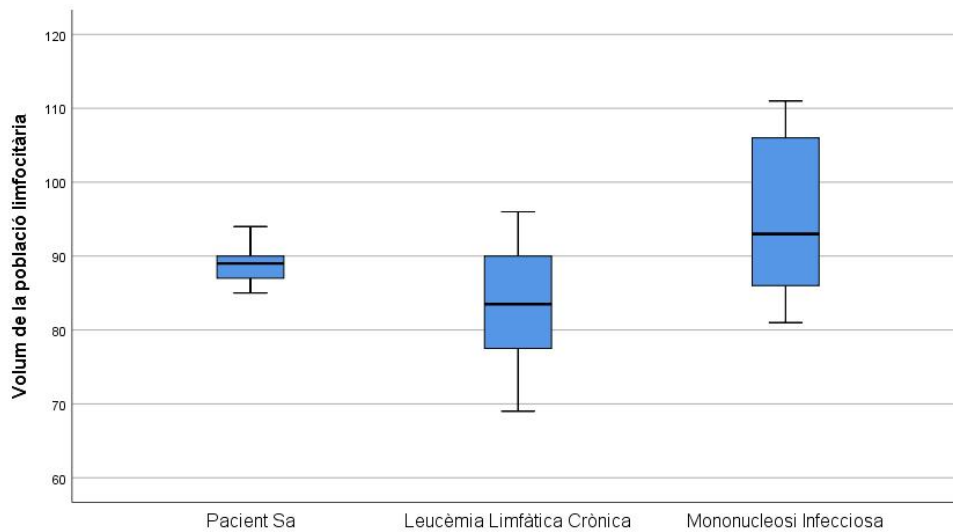
	Limfocitosis Reactiva			LLC			Mononucleosi Infecciosa		
	Mitjana	25%	75%	Mitjana	25%	75%	Mitjana	25%	75%
VPL	89	87	90	83	78	90	95	86	106

Taula 5: Resultats extrets del Excel pel valor del Volum de població limfocitària (SPSS). Podem veure com les mitjanes de les tres condicions són diferents entre elles, la més gran la de la mononucleosi (VPL: volum població limfocitària; LLC: leucèmia limfàtica crònica).

L'ample de la corba entre el percentil 25% i el 75% depèn del moment que analitzem la malaltia. Si analitzéssim una malaltia que és recent en un pacient, la corba ens sortiria normal, ja que hi hauria poques cèl·lules infectades, però si l'analitzéssim quan el pacient ja la té de fa bastant temps podem observar que en el cas de la LLC la corba serà més estreta ja que el volum i forma de les seves cèl·lules són més petites de l'habitual, en el cas de la mononucleosi la corba serà més ampla ja que el volum i forma de les seves cèl·lules són més grans de l'habitual, i en el cas de la Limfocitosis

Reactiva la corba seria normal ja que el volum i forma les seves cèl·lules son molt similars a les sanes.

Si posem en un gràfic de caixes i bigotis (gràfic 6) aquests resultats veiem com en els pacients sans (limfocitosis reactiva) el VPL es troba al voltant de 80 fL (mitjana amb la ratlla negra dins la caixa). Aquesta ratlla és veu més per sota en el cas de les LLC i més per sobre en el cas de les Mononucleosi Infecciosa.



Gràfic 6: resultat de l'anàlisi estadística amb diagrama de caixes on es relaciona el Volum Població Limfocitària amb grup patològic. Els resultats son significatius, és a dir que les diferències observades entre grups son reals. Gràfica obtinguda utilitzant el programa SPSS.

Aquests resultats demostren que aquest paràmetre, el Volum Població Limfocitària pot ser útil quan mirem les dades de l'hemograma i per tant en el primer pas del diagnòstic al laboratori dels pacients que tenen Limfocitosi. Cal fer estudis d'estadística amb molts més pacients per poder donar validesa a aquesta hipòtesi.

DISCUSSIÓ I CONCLUSIONS

4. DISCUSSIÓ I CONCLUSIONS

Començaré aquesta part del treball mirant de treure conclusions dels resultats que he presentat. La idea principal pel treball de recerca era semblant al treball final que ha sorgit; cal dir que vaig anar afegint coses que he considerat peces clau per la meua recerca. Segons anava fent varem decidir afegir al treball un punt d'originalitat i utilitzar unes dades sobre un paràmetre que mai havia estat publicat. El motiu d'aquesta incorporació al treball va ser que la màquina que he usat per aquests casos es troba a l'Hospital Santa Caterina de Girona des de fa uns mesos i es troba en fase d'avaluació pels facultatius del laboratori d'Hematologia.

Considero que he assolit tots els coneixements que necessitava i els resultats obtinguts son els esperats. L'aprenentatge ha estat molt útil pel que penso que vull estudiar en un futur.

Estic satisfet amb la meua feina ja que considero que he adquirit molts coneixements nous i que m'he familiaritzat amb tres malalties totalment diferents relacionades amb la sang: se perquè passa, perquè està causada, qui les pateix, com es diagnostica, la metodologia necessària per poder arribar al diagnòstic... entre d'altres.

Al tornar a llegir els objectius que vaig formular al principi del treball i al principi de la part pràctica, considero que he assolit cadascun d'ells inclús algun altre que no m'esperava.

M'agradaria destacar un dels objectius que tenia principalment abans de començar el treball de recerca: poder apropar-me a la malaltia a través de pacients reals per saber el que es viu quan realment estàs interactuant amb una persona que té una de les malalties estudiades. M'ha agradat aprendre com arribar al seu diagnòstic per aconseguir el benestar de aquella persona. M'ha servit per mantenir-me motivat en tot moment i tenir ganes de continuar fent el que m'agrada que es poder ajudar a una persona que no es troba en un estat de salut complert.

Aniré discutint els resultats punt per punt de forma breu:

1. Anàlisi de la limfocitosi al laboratori.

Un cop acabat el treball puc treure com a conclusions que el diagnòstic de totes les malalties estudiades en aquest treball comencen el seu procés quan l'hemograma ens determina una limfocitosi (xifra superior als 5.000 limfòcits/ μ L) en la sang del pacient. A partir d'aquí tots passen per l'anàlisi al microscopi o citologia per apropar-se més al diagnòstic final, i es en aquesta part de el procés en la que cada tipus de malaltia es tractada de manera diferent ja que la mida, la forma i la quantitat de les cèl·lules que componen cada tipus de malaltia son totalment diferents.

Per tant, puc treure com a **PRIMERA CONCLUSIÓ** que tots els pacients que tenen una de les tres malalties incloses es comencen a diagnosticar sempre amb el mateix procés, però acaben de manera única, és a dir, que com que tots els pacients tenen dades diferents i percentatges de les cèl·lules diferents, a la hora de fer el diagnòstic, en cada cas es passarà per camins diferents dins de l'algoritme que li correspon.

Com a **SEGONA CONCLUSIÓ**, puc dir que l'edat té una relació directa amb el tipus de malaltia estudiat. Amb l'anàlisi de caixes i bigotis he demostrat que els pacients joves solen tenir infeccions víriques mentre que els grans solen presentar quadres cancerígens.

2. Estudi comparatiu dels tres pacients escollits.

En l'estudi dels 3 pacients estudiats de forma detallada, podem concloure que en un principi els 3 hemogrames indicaven una mateixa situació patològica ja que les alarmes quantitatives (més de 5.000 limfòcits/ μ L) i les qualitatives (l'alarma *Abn Lymph*) referents a la població de limfòcits presentaven els mateixos resultats.

Després de l'observació de les cèl·lules al microscopi òptic (citologia) es va veure que les cèl·lules de cada pacient eren morfològicament diferents.

Les principals diferències van ser la mida, el volum i la forma. Aquest anàlisi ens orienta cap a malalties diferents, i per tant, cada pacient va seguir el seu algoritme fins arribar al seu diagnòstic final.

Aprofundint més en el tema de la limfocitosi reactiva, he descobert que no cal dur a terme més proves després de la citologia per acabar de confirmar-ho. En el cas de la Mononucleosi infecciosa, he pogut confirmar no es pot diagnosticar només amb l'hemograma ja que els resultats que ens dona poden coincidir amb altres tipus de malaltia. Hauríem de seguir l'algoritme i fer la citologia, on ens orientarem cap a la necessitat de fer serologia. Si mirem la gràfica de caixa i bigotis de les edats, arribem a la conclusió que és una malaltia comú entre nadons, nens i adolescents fins a un màxim de 22 anys.

En el cas de la LLC (Leucèmia Limfàtica Crònica), he pogut observar que no en tenim prou amb les dades que ens dona l'hemograma per tenir una idea del que és ja que es pot confondre amb moltes coses i que cal fer més proves per arribar al seu diagnòstic final. Com hem dit a la part teòrica, les cèl·lules de la LLC són en gran quantitat i de volum molt petit, però tot i veient això a la prova de la citologia no en tindríem prou per saber si és una LLC realment.

En el següent procés, la citometria de flux específica, podrem saber si es una LLC sempre que les gràfiques que obtenim com a resultat ens validen que el pacient té un percentatge de CD19 elevat. Al mirar la gràfica de caixa i bigoti he arribat a la conclusió que aquesta malaltia és molt més abundant en persones d'una edat avançada, dels 70 als 83 anys.

Per tant, com a **TERCERA CONCLUSIÓ** puc dir que a partir de una mateixa condició patològica es pot arribar a diferents diagnòstics i que és molt important seguir els processos analítics necessaris per confirmar la malaltia.

Com a **QUARTA CONCLUSIÓ** dir que la limfocitosi reactiva no és una condició patològica, que la Mononucleosi és més habitual en edats joves de la vida i la LLC és més típic d'edats avançades.

3. Utilitat del Volum de Població Limfocitària.

Al laboratori, com en altres àmbits de la ciència, és imprescindible investigar per poder avançar en el diagnòstic de les malalties. Les empreses que fabriquen analitzadors contribueixen en aquesta millora proporcionant millors aparells. Part d'aquesta millora són els nous paràmetres de l'hemograma, entre ells el volum de la població limfocitària.

En l'anàlisi del 10 pacients amb el paràmetre del Volum de la població limfocitària, vaig formular una hipòtesi de com ens podríem anticipar a la malaltia que tenia el pacient abans de dur a terme la prova de la citologia.

La meua hipòtesi consistia en mirar la mida dels limfòcits (de tota la població del pacient) abans de la citologia per saber si pot donar una orientació de quina possible malaltia es tracta.

Considerant que la mida esperada dels limfòcits és la dels pacients sans o amb una limfocitosi reactiva però sense malaltia, podem mirar com són respecte aquest valor els limfòcits d'un pacient amb LLC o amb Mononucleosi Infecciosa.

També podem mirar l'amplitud de la corba que té la població limfocitària, és a dir, la distància que hi ha entre els limfòcits més petits del pacient (zona de l'esquerra de la corba) i els més grans (zona de la dreta de la corba). Si la corba és molt estreta vol dir que l'amplitud és poca i la població és molt semblant de tamany (o bé tots molt petits o tots molt grans, però molt iguals). Si la distància entre els dos extrems de la corba és gran vol dir que la diferència entre la cèl·lula més petita i la més gran, és elevada.

Concretament, si el volum dels limfòcits és inferior del normal, per tant, l'amplitud de la corba és estreta, podem dir que és una possible LLC. Si per contra el volum dels limfòcits és més gran del normal i per tant l'amplitud de la corba és gran, podem dir que és una possible mononucleosi infecciosa.

Per tant, puc dir que la meua **CINQUENA CONCLUSIÓ** és que a partir de la observació de el volum dels limfòcits, podem tenir una idea aproximada del diagnòstic final abans de dur a terme la citologia i així proporcionar una informació molt útil en el primer moment del diagnòstic dels pacients.

Com a **SISENA CONCLUSIÓ** dir que mirant la distància o amplitud de la corba de la població dels limfòcits podem saber com d'homogènia o igual de mida és aquesta població i per tant ajudar a l'orientació diagnòstica del pacient.

Al dur a terme aquest treball, m'he adonat que la tecnologia al laboratori és molt més abundant del que esperava, i que cada cop està incrementant més degut als nous avenços científics. Els aparells son complexes, grans i hi arriben moltes mostres cada dia; tots els pacients s'analitzen en 24 hores i per tant els analitzadors son ràpids i fiables.

Per fer tota aquesta feina calen moltes persones. Al laboratori de Santa Caterina hi treballen 88 persones repartides en tres torns (matí, tarda i nit). La gran majoria de persones que treballen al laboratori son tècnics que son els que fan la part pràctica (posen els aparells a punt, reben i distribueixen les mostres i les processen). Una part menys nombrosa son els metges especialistes en Anàlisis Clíniques. Ells son els que treballen amb els resultats obtinguts per arribar al diagnòstic final. Analitzen tots els resultats en diferents àrees del laboratori i son els que decideixen si s'ha de fer més proves o si cal enviar al pacient a l'hospital a urgències.

Personalment estic molt content de la feina que he fet i de el tema i el procés que he escollit per dur a terme el meu treball de recerca ja que he entrat en el sector mèdic i he pogut experimentar dins l'àmbit en el que m'agrada moure'm. He experimentat en moltes de les situacions que es poden donar a un laboratori des de el dia més relaxat on hi havia feina més normal fins al dia que hem hagut de córrer i que l'estrès es respirava al laboratori, però m'ha servit per saber realment la pressió que té cada treballador d'un laboratori clínic.

Com a conclusió final, estic orgullós del treball ja que considero que ha estat un procés de superació que m'ha fet entendre el que realment m'agrada i al que possiblement em voldria dedicar.

CONCLUSIONS

- **PRIMERA CONCLUSIÓ:** tots els pacients es comencen a diagnosticar amb el mateix procés, però acaben de manera única.
- **SEGONA CONCLUSIÓ:** l'edat té una relació directa amb el tipus de malaltia estudiat.
- **TERCERA CONCLUSIÓ:** és molt important seguir els processos analítics necessaris per confirmar la malaltia.
- **QUARTA CONCLUSIÓ:** la limfocitosi reactiva no és una condició patològica, que la Mononucleosi és més habitual en edats joves de la vida i la LLC és més típic d'edats avançades.
- **CINQUENA CONCLUSIÓ:** a partir de la observació de el volum dels limfòcits podem tenir una idea aproximada del diagnòstic final abans de dur a terme la citologia.
- **SISENA CONCLUSIÓ:** la distància o amplitud de la corba de la població dels limfòcits ajuda a l'orientació diagnòstica del pacient.

5. AGRAÏMENTS

M'agradaria agrair la gran rebuda per part de tot el Laboratori Clínic de l'Hospital Santa Caterina (Parc Hospitalari Martí i Julià) de Salt per incloure'm dins de l'equip com si fos un integrant més sense importar el fet de ser estudiant i no tenir experiència; sempre han resolt els meus dubtes quan els he necessitat i preguntat.

Vull donar les gràcies especialment al Dr. Manel Ramírez, Dra. Anna Marull i Dra. Maite Serrando per ser els meus guies durant la meva estada al laboratori i per aportar-me tots els coneixements que he necessitat per fer el treball. Al Dr. Fernando Calvo per suggerir un dels punts més rellevants dels resultats del meu treball.

També estic molt agraït amb la Sra. Maite Quintana, tècnic de citometria de flux, per orientar-me i ensenyar-me tot a l'hora de fer la part pràctica i per la seva bona companyia durant tots aquests dies. També al Dr. Xavier Nieto per proporcionar-me tota la informació, programes i coneixements per dur a terme la majoria de les gràfiques incloses al treball i per el seu suport. Per últim voldria donar les gràcies a tota la gent que ha format part d'aquest treball, família i amics. Em resulta impossible citar-vos a tots sense estendre'm moltíssim, i voldria que tothom es sentís esmentat. A tots vosaltres, GRÀCIES.



BIBLIOGRAFIA I WEBGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA I WEBGRAFIA

1. BARBARA J. BAIN. *Blood cells, a practical guide*. London: Wiley Blackwell, 2015, Chapters
2. CARRERAS, J., Google Chrome, <https://www.fcarreras.org/es/LLC> , 15 de Juliol de 2019
3. COBO MARTINEZ, F.; ALEJO GARCÍA BAUTISTA, J. *Hematología del laboratorio a la parte clínica*. Jaén: Formación Alcalá, 2010, capítulo 1
4. COBO MARTINEZ, F.; ALEJO GARCÍA BAUTISTA, J. *Hematología del laboratorio a la parte clínica*. Jaén: Formación Alcalá, 2010; Capítulo 2
5. COBO MARTINEZ, F.; ALEJO GARCÍA BAUTISTA, J. *Hematología del laboratorio a la parte clínica*. Jaén: Formación Alcalá, 2010; capítulo 3
6. ESPÓSITO BARREIRO, C., Google Chrome, <https://www.fisiodue.com/leucocitos/> , 14 de Juliol de 2019
7. HENRY'S ; *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. McPherson and Pinctus, Elsevier 2017. Capítol 34, página 65
8. HENRY'S ; *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. McPherson and Pinctus, Elsevier 2017. Capítol 31, página 54
9. KENNETH M. KAYE., Google Chrome, <https://www.msdmanuals.com/es-es/professional/enfermedades-infecciosas/virus-herpes/mononucleosis-infecciosa> , 14 de Juliol de 2019
10. MERINO, A. *Manual de citología de sangre periférica*. Madrid: Grupo Acción Médica, 2005; Capítulo 1: páginas 1-45
11. MERINO, A. *Manual de citología de sangre periférica*. Madrid: Grupo Acción Médica, 2005; Capítulo 2: páginas 47-78
12. MERINO, A. *Manual de citología de sangre periférica*. Madrid: Grupo Acción Médica, 2005; Capítulo 9: páginas 191-229

13. STELER-STEVENSON, M; CHERIAN, S; YUAN, C. "Flow cytometry". Chapter 5. US National Library of Medicine National Institutes of Health.
14. VAQUERO, J., Google Chrome, <https://www.cmrh.eu/plataformas-tecnicas/citometria.html> , 15 de Juliol de 2019