

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



## **Programa de doctorado en Medicina**

Departamento de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

# **UTILIDAD CLÍNICA DE LAS MAGNITUDES *CELL* *POPULATION* DATA OBTENIDAS EN EL HEMOGRAMA EN EL DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE ENFERMEDADES HEMATOLÓGICAS Y NO HEMATOLÓGICAS**

Tesis Doctoral presentada por  
**CRISTIAN MORALES INDIANO**

Para optar al título de **Doctor** por la Universitat Autònoma de Barcelona

Tesis realizada bajo la dirección  
de la **Dra. Blanca Xicoy Cirici**, la **Dra. MªAntonia Llopis Díaz**  
y la tutoría del **Dr. Josep Mª Ribera Santasusana**



# AGRADECIMIENTOS

Es el momento de parar para reflexionar, mirar hacia atrás y valorar todo lo que me llevo de este proyecto, que es mucho. Es mucho el tiempo invertido, el esfuerzo y mucha la dedicación, pero también son muchos los buenos momentos, las vivencias y las risas, pero sobre todo son muchas las personas que lo han hecho posible. A todas y cada una de ellas ¡GRACIAS!

Gracias a mi otra parte, **Meri** (SuperMerit), sin ti esto no hubiera sido posible. Siempre has creído en mí y me has apoyado incondicionalmente, sin tu ayuda en infinidad de ocasiones no lo hubiera conseguido. Has pasado por demasiados momentos difíciles y a pesar de ello, siempre has estado a mi lado. ¡¡Gracias infinitas!! **Hugo, Yago**, sois enormemente geniales. Habéis entendido a la perfección lo que necesitaba, vuestros consejos tienen demasiado sentido. Gracias por toda la energía que me transmitís y por todos los momentos que pasamos juntos. ¡Por muchos más! Gracias también a mis padres, sin ellos yo no sería como soy. **Papa, mama**, os tengo que agradecer inmensamente las grandes personas que sois y todo lo que habéis hecho por mí. A mi hermano **Marc**, por estar ahí siempre que lo he necesitado, por tu apoyo en todo momento y por cuidarnos como lo haces. Sin todos vosotros no estaría aquí hoy. ¡Gracias family!

A mis directoras de tesis, **M<sup>a</sup> Antonia y Blanca**, no podría haber conseguido tener un mejor dúo de directoras. Gracias por creer desde el principio en el proyecto, por unir aún más la hematología del laboratorio y la clínica. Gracias por la confianza que habéis depositado en mí, gracias por todo el trabajo que habéis hecho y gracias por estar siempre disponibles cuando os he necesitado. He aprendido mucho de las dos, sois un ejemplo a seguir para muchos. Sin vuestros consejos y ayuda no lo hubiera conseguido ¡¡Gracias!! Al **Dr. Ribera**, tutor de la tesis y un referente para mí. Gracias por creer también en el proyecto, en el laboratorio y en mí, gracias por sus sabios consejos y por siempre tener disponibilidad para atenderme.

A mis compis de sección, de ahora y de antes, con las que he podido compartir muchos buenos momentos de la tesis y no tesis. Vosotros me habéis hecho crecer en muchos aspectos. Gracias **Àngels S., Laura J., Xavi T., Orlando J.** por la confianza y ayuda en todo momento y, sobre todo, gracias **Alba L. y Alicia M.** Vosotras dos me habéis sufrido

más de la cuenta y habéis sido clave para poder conseguir todo lo que hemos conseguido juntos, que bien sabéis es mucho. Habéis creído en mí desde el principio, me habéis seguido el rollo con mi tema sobre que el mundo está lleno de CPDs :) y me habéis ayudado en muchos momentos, gracias. **Alicia M.**, a ti especialmente quiero agradecerte todo lo que has hecho y haces por mí, saber que hay alguien como tú cuando te das la vuelta y miras atrás no tiene precio. ¡Mil gracias por todo!

A todos los resis que han pasado durante estos años por la sección de Hematología-Core y les he enganchado de alguna manera con los CPDs, gracias **Xavi N., Irene R., Maria L., Diana R., Carla F., Miguel G., Laura J., Elena R., Jenni R., Pablo G., Bea G., Alvaro P.**, sois la futura revolución de los datos.

A **todo el personal técnico** de Hemato que me ha ayudado a buscar pacientes, preparar peticiones, analizar muestras, obtener resultados y tantas otras cosas. Sois la base de cualquier laboratorio clínico y una parte imprescindible en él, así como lo habéis sido para mí en este proyecto. Especialmente, **Lucía G., María F., Alicia C., Joel R., Silvia T., Komal Q., Ari J., Carmen V., Lidia R., Lidia F.**, Gracias.

Al superequipo de UCI, **Fernando A., Alba H., Bea C., Pilar M.**, mil gracias por la confianza y por toda la ayuda para poder llevar a cabo el proyecto en UCI. ¡Sois geniales! A vosotros especialmente, **Fernando A.** por tus sabios consejos y **Alba H.** por esa energía interminable, agradecerlos todo el tiempo que me habéis dedicado, la complicidad que hemos generado y los buenos momentos que hemos pasado. Por muchos más proyectos juntos. A mi compi de batallas sobre monocitos en Urgencias, **Neus R.**, moltíssimes gràcies pel teu recolzament, per les teves xerrades i per creure en el laboratori. Sense la teva colòaboració i ajuda no ho haguessim aconseguit. A **Mariajo**, mil gracias por tu dedicación, entusiasmo y avisarme siempre que había un nuevo diagnóstico de SMD. A **Inés H.**, per la teva gran dedicació i les ganes que sempre tens d'ajudar-me, em compartit quantitat de bons moments, fas les coses molt fàcils, gràcies per estar sempre disponible. **Diana C., Iris C. y Lili T.**, gracias por vuestro incansable trabajo, gracias por la confianza que habéis depositado en el equipo y por todo lo que hemos aprendido con vosotras.

También quiero agradecer la influencia que he tenido durante este periodo de personas realmente especiales para mí. **Susana M.**, mi R gran, tu altruismo incondicional y ayuda

en todo momento es brutal, mil gracias por estar a mi lado en este último tiempo y querer emprender juntos un nuevo reto. **Marc S.**, el teu cap és formidable. Des de l'inici ens hem retroalimentat mutuament, de cada conversa amb tu sempre sortia un projecte, una idea o qualsevol altra cosa amb massa sentit. Gràcies per tota l'ajuda que m'has ofert, per la teva energia i per aquesta ment tan privilegiada que tens. **María M.**, tu apoyo y ayuda en estos últimos meses, liberándome de gran parte de mis actividades, han sido clave para que pudiera conseguir mis metas, te estoy enormemente agradecido. Gracias por estar ahí. **Maite S.**, gràcies pel recolzament en tot moment, per fer-me veure les coses desde una altra perspectiva, animar-me sempre que ho he necessitat i aconsellar-me en moments difícils. Has estat una peça clau per mi en aquests anys. **Àngels D.** i **Joan G.**, sempre heu cregut en mi, en la nostra manera de fer i de com disfrutem de la hematologia. Gràcies per les fantàstiques persones que sou, per tota l'ajuda i consells que m'heu donat, sobre l'hematologia i no hematologia, i sobretot gràcies pels bons moments que hem passat junts.

De verdad, **GRACIAS a TODOS** por confiar y acompañarme en este camino, hacerlo solo no hubiera tenido ningún sentido. He disfrutado mucho de todos vosotros. ¡¡Al final lo hemos conseguido!!

"Si quieres ir rápido, camina solo. Si quieres llegar lejos, camina acompañado"

*Proverbio africano*

*Cristian Morales-Indian*

#9



## **LISTADO DE ABREVIATURAS**

## Listado de abreviaturas

**CPD:** *Cell Population Data*

**VCSn:** Volumen, Conductividad y Dispersión láser.

**V:** volumen

**C:** conductividad

**Sn:** dispersión de la luz láser

**MN:** media posicional de CPD

**SD:** desviación estándar de CPD

**SM:** dispersión láser ángulo medio (9<sup>0</sup>-43<sup>0</sup>)

**SU:** dispersión láser ángulo alto (20<sup>0</sup>-43<sup>0</sup>)

**SL:** dispersión láser ángulo bajo (9<sup>0</sup>-19<sup>0</sup>)

**SA:** dispersión láser ángulo axial SA (5<sup>0</sup>)

**AL2:** dispersión láser ángulo lateral AL2 (0<sup>0</sup>)

**RET:** población de reticulocitos

**NonRET:** población de eritrocitos

**MN-V-RET:** media posicional del volumen de la población de reticulocitos

**SD-V-RET:** desviación estándar del volumen de la población de eritrocitos

**MN-C-RET:** media posicional de la conductividad de la población de reticulocitos

**SD-C-RET:** desviación estándar de la conductividad de la población de eritrocitos

**MN-V-NonRET:** media posicional del volumen de la población de reticulocitos

**SD-V-NonRET:** desviación estándar del volumen de la población de eritrocitos

**MN-C-NonRET:** media posicional de la conductividad de la población de reticulocitos

**SD-C-NonRET:** desviación estándar de la conductividad de la población de eritrocitos

**CBC:** recuento celular sanguíneo (cell blood count)

**AF:** anemia ferropénica

**BT:** β-talasemia

**SMD:** Síndromes Mielodisplásicos

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**DIFF:** canal diferencial de 5 subpoblaciones leucocitarias

**GC:** grupo control

**CRDM:** Citopenia Refractaria con Displasia Multilínea

**AREB:** Anemias Refractarias con Exceso de Blastos

**ARSA:** Anemias Refractarias con Sideroblastos en Anillos

**MN-V-NE:** media posicional del volumen de la población de neutrófilos

**SD-V-NE:** desviación estándar del volumen de la población de neutrófilos

**MN-C-NE:** media posicional de la conductividad de la población de neutrófilos

**SD-C-NE:** desviación estándar de la conductividad de la población de neutrófilos

**MN-SM-NE:** media posicional del ángulo medio de la población de neutrófilos

**SD-SM-NE:** desviación estándar del ángulo medio de la población de neutrófilos

**MN-SU-NE:** media posicional del ángulo alto de la población de neutrófilos

**SD-SU-NE:** desviación estándar del ángulo alto de la población de neutrófilos

**MN-SL-NE:** media posicional del ángulo bajo de la población de neutrófilos

**SD-SL-NE:** desviación estándar del ángulo bajo de la población de neutrófilos

**MN-SA-NE:** media posicional del ángulo axial de la población de neutrófilos

**SD-SA-NE:** desviación estándar del ángulo axial de la población de neutrófilos

**MN-AL2-NE:** media posicional del ángulo lateral de la población de neutrófilos

**SD-AL2-NE:** desviación estándar del ángulo lateral de la población de neutrófilos

**AUC:** área bajo la curva

**m:** media

**de:** desviación estándar estadística

**DP%:** diferencial porcentual

**M:** mediana

**IQ:** intervalo intercuartil

**HPT:** hepatopatía

**ERC:** enfermedad renal crónica

**IC95%:** intervalo de confianza del 95%

**%HGRAN:** porcentaje de neutrófilos hipogranulados

**%HSEG:** porcentaje de neutrófilos hiposegmentados

**MDW:** Monocyte Distribution Width/Amplitud de Distribución de Monocitos.

**UCI:** Unidad de Cuidados Intensivos

**qSOFA:** quick Sequential Organ Failure Assessment

**SOFA:** Sequential Organ Failure Assessment

**SIRS:** Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica

**APACHE II:** acute physiology and chronic health evaluation II

**PCR:** proteína C reactiva

**PCT:** procalcitonina

**SD-V-MO:** desviación estándar del volumen en la población de monocitos

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético

**LPS:** Hospital Pitié-Salpêtrière APHP-Sorbonne Université

**HGT:** Hospital Universitari Germans Trias i Pujol

**LEU:** recuento de leucocitos totales

**VPP:** valor predictivo positivo (VPP)

**VPN:** valor predictivo negativo (VPN)

**LR+:** cocientes de probabilidad positivo

**LR-:** cociente de probabilidad negativo

**GEE:** Generalized Estimating Equation

**OR:** odds ratio

**NIH:** National Institutes of Health

**PaFi [PO2/FiO2]:** relación entre la presión parcial de oxígeno arterial y la fracción de oxígeno inspirado.

**FR:** frecuencia respiratoria.

**IL-6:** interleucina 6

# ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. El hemograma y su importancia como prueba diagnóstica .....	6
1.2. Tecnología VCSn y obtención de los <i>Cell Population Data</i> .....	7
1.3. Posibles aplicaciones clínicas de los <i>Cell Population Data</i> .....	13
1.3.1. Diagnóstico diferencial de microcitosis .....	13
1.3.2. Los Síndromes Mielodisplásicos.....	17
1.3.3. La Sepsis y la importancia de su detección precoz. ....	24
2. HIPOTESIS.....	30
3. OBJETIVOS.....	32
3.1. Objetivo principal .....	33
3.2. Objetivos secundarios .....	33
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	34
4.1. TRABAJO 1. ESTUDIO DE LOS <i>CELL POPULATION DATA</i> DE SERIE ROJA EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LAS MICROCITOS.....	38
4.2. TRABAJO 2. EVALUACIÓN DE LOS <i>CELL POPULATION DATA</i> DE LA POBLACIÓN DE NEUTRÓFILOS EN EL DIAGNÓSTICO DE LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS. ....	41
4.2.1. Estudio 2.1. Valoración de los <i>Cell Population Data</i> en pacientes con Síndrome Mielodisplásico.....	41
4.2.2. Estudio 2.2. Distinción entre Síndromes Mielodisplásicos y citopenias no clonales mediante el estudio de <i>Cell Population Data</i> .....	43
4.2.3. Estudio 2.3. Detección de disgranulopoyesis: utilidad de los <i>Cell Population Data</i> de la población de neutrófilos.....	44
4.3. TRABAJO 3. EVALUACIÓN DE LOS <i>CELL POPULATION DATA</i> DE LA POBLACIÓN DE MONOCITOS EN EL DIAGNÓSTICO PRECOZ DE SEPSIS. ....	46
4.3.1. Estudio 3.1. Evaluación del MDW en el diagnóstico precoz de sepsis en pacientes que acuden a urgencias.....	46

4.3.2. Estudio 3.2. Utilidad del MDW en el diagnóstico y pronóstico de pacientes con sepsis que ingresan en UCI.....	48
4.3.3. Estudio 3.3. Eficacia del MDW como biomarcador de cribado en la identificación de pacientes con COVID19 que acuden a urgencias.....	50
5. RESULTADOS.....	53
5.1. TRABAJO 1. ESTUDIO DE LOS <i>CELL POPULATION DATA</i> DE SERIE ROJA EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LAS MICROCITOS.....	54
5.2. TRABAJO 2. EVALUACIÓN DE LOS <i>CELL POPULATION DATA</i> DE LA POBLACIÓN DE NEUTRÓFIOS EN EL DIAGNÓSTICO DE LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS. ....	62
5.2.1. Estudio 2.1. Valoración de los <i>Cell Population Data</i> en pacientes con Síndrome Mielodisplásico.....	62
5.2.2. Estudio 2.2. Distinción entre Síndromes Mielodisplásicos y citopenias no clonales mediante el estudio de <i>Cell Population Data</i> .....	65
5.2.3. Estudio 2.3. Detección de disgranulopoyesis: utilidad de los <i>Cell Population Data</i> de la población de neutrófilos.....	71
5.3. TRABAJO 3. EVALUACIÓN DE LOS <i>CELL POPULATION DATA</i> DE LA POBLACIÓN DE MONOCITOS EN EL DIAGNÓSTICO PRECOZ DE SEPSIS. ....	75
5.3.1. Estudio 3.1. Evaluación del MDW en el diagnóstico precoz de sepsis en pacientes que acuden a urgencias.....	75
5.3.2. Estudio 3.2. Utilidad del MDW en el diagnóstico y pronóstico de pacientes con sepsis que ingresan en UCI. ....	78
5.3.3. Estudio 3.3. Eficacia del MDW como biomarcador de cribado en la identificación de pacientes con COVID19 que acuden a urgencias.....	84
6. DISCUSIÓN.....	88
7. CONCLUSIONES.....	99
8. LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS.....	102
9. BIBLIOGRAFÍA.....	104
10. ANEXOS.....	110
10.1. Publicaciones a congresos nacionales e internacionales.....	111
10.1.1. Usefulness of Lymphocyte CPD parametres in Beckman Coulter DxH900 Hematology analyzer in lymphoproliferative chronic disorders and viral infection diagnosis. ....	111

10.1.2. Clinical implementation of a new formula in differential diagnosis of microcytic anemia.....	112
10.1.3. Detecting cytological dysplasia: usefulness of cell morphology parameters offered by DxH900 hematology analyzer.....	113
10.1.4. Distinction between myelodisplastic síndrome and nonclonal cytopenias by celular morphometric parameters analysis .....	114
10.1.5. Análisis de los Cell Population Data (CPD) en personas sanas y en pacientes con Síndrome Mielodisplásico (SMD).....	115
10.1.6. Influence of K2-EDTA and K3-EDTA tubes for monocyte distribution width measurement.....	116
10.1.7. Usefulness of cell morphology parameters for detection and diagnosis of acute leukemias. ....	117
10.1.8. The value of Cell Population Data for screening and diagnosis of hereditary spherocytosis. ....	118
10.1.9. Role of Cell Population Data in the Differential Diagnosis of Lymphocytosis. 119	
10.1.10.The Role of Cell Population Data on Beckman Coulter DxH-800 in Differential diagnosis of iron deficiency anemia and thalassemia trait .....	120

# RESUMEN

El hemograma es una de las pruebas de laboratorio solicitadas con mayor frecuencia por parte de los clínicos; es fácilmente realizable y altamente rentable, aportando una información valiosa en la orientación diagnóstica de diversas enfermedades, tanto hematológicas como no hematológicas. Su determinación incluye el análisis cuantitativo y cualitativo en sangre periférica de las tres series hematopoyéticas: eritrocitaria, leucocitaria y plaquetaria.

Los actuales analizadores hematimétricos combinan varias tecnologías con el fin de proporcionar la máxima información celular posible de manera exacta y reproducible. Además, el uso de varios complejos algoritmos innovadores permite optimizar los resultados obtenidos, clasificar las poblaciones celulares de manera precisa y valorar la presencia de posibles alarmas cualitativas, detectando atipias celulares presentes en sangre periférica.

En la actualidad, las tecnologías disponibles en los analizadores de hematología permiten disponer de nuevas magnitudes celulares, denominadas "*Cell Population Data*" (CPD), que reflejan de manera específica y cuantitativa características morfológicas de determinadas poblaciones celulares, como los eritrocitos, reticulocitos, neutrófilos, linfocitos o monocitos.

El uso de determinados CPDs podría mejorar el diagnóstico y pronóstico de diferentes enfermedades. Con estas premisas, se ideó y diseñó este proyecto de tesis, constituido por diferentes estudios que pretenden demostrar el uso de los CPD en distintos escenarios clínicos. La presente tesis está formada por tres trabajos que pretenden demostrar la validez clínica de: 1) los CPDs de serie roja en el diagnóstico diferencial de las microcitosis, 2) los CPDs de neutrófilos en el diagnóstico de síndromes mielodisplásicos y 3) los CPDs de monocitos en identificación precoz de la sepsis.

Los resultados obtenidos en los estudios demuestran que el uso de los CPDs permite detectar cambios morfológicos en las células sanguíneas en respuesta a diferentes

procesos clínicos, mejorando la detección precoz de determinadas enfermedades, tanto hematológicas como los síndromes mielodisplásicos, como no hematológicas tales como las infecciones o diferentes tipos de anemias. La implementación de los CPDs en la práctica asistencial mejoría el diagnóstico y pronóstico de diferentes enfermedades.

## ABSTRACT

The cell blood count (CBC) and differential leucocytes (DIFF) is one of the laboratory tests most frequently requested by clinicians; it is easily performed and highly cost-effective, providing valuable information in the diagnostic orientation of various diseases, including hematological and non-hematological. Its determination includes quantitative and qualitative evaluation in peripheral blood of the three hematopoietic series: erythrocyte, leukocyte and platelet.

Current hematology analyzers combine several technologies in order to provide the maximum possible cellular information in an accurate and reproducible manner. In addition, the use of several complex innovative algorithms allows optimizing the results obtained, classifying cell populations accurately and assessing the presence of possible qualitative alarms, detecting cellular atypia present in peripheral blood.

Currently, the technologies available in hematology analyzers provide new cellular magnitudes, called "Cell Population Data" (CPD), which specifically and quantitatively reflect morphological characteristics of cell populations, such as erythrocytes, reticulocytes, neutrophils, lymphocytes or monocytes.

The use of certain CPDs could improve the diagnosis and prognosis of different diseases. With these premises, this thesis project was conceived and designed consisting of different studies that aim to demonstrate the use of CPDs in different clinical scenarios. The present thesis consists of three studies that aim to demonstrate the clinical validity of: 1) red blood cells CPDs in the differential diagnosis of microcytosis, 2) neutrophil CPDs in the diagnosis of myelodysplastic syndromes and 3) monocyte CPDs in the early identification of sepsis.

The results obtained in the studies demonstrate that the use of CPDs allows the detection of morphological changes in blood cells in response to different clinical processes, improving the early detection of certain diseases, both hematological such as myelodysplastic syndromes, and non-hematological such as infections or different types

of anemias. The implementation of DPCs in healthcare practice improves the diagnosis and prognosis of different diseases.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. El hemograma y su importancia como prueba diagnóstica

El hemograma es una de las pruebas analíticas solicitadas con mayor frecuencia, rápida de realizar y altamente rentable, constituyendo una prueba guía en la sospecha diagnóstica de diferentes enfermedades (1). El hemograma proporciona información sobre las células que componen las tres series hematopoyéticas; eritrocitaria, leucocitaria y plaquetar. Los datos del hemograma no solo incluyen el recuento de eritrocitos, leucocitos y plaquetas, sino que también informa sobre la concentración de hemoglobina, los índices eritrocitarios, así como sobre las diferentes subpoblaciones leucocitarias (neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos). La valoración de la concentración de hemoglobina junto con el recuento de eritrocitos y sus índices, permite hacer una primera aproximación sobre el tipo de anemia que nos podemos encontrar. Por su parte, resultados del recuento de leucocitos y la obtención de sus poblaciones, pueden ayudar a evaluar tanto procesos infecciosos como a identificar determinadas neoplasias hematológicas. Por lo tanto, el hemograma puede ser considerado un primer indicador de enfermedad constituyendo una prueba inicial para el diagnóstico diferencial, permitiendo realizar el seguimiento y valorar la progresión de enfermedades hematológicas y no hematológicas.

La información que proporciona hoy en día la realización del hemograma se debe a la incorporación progresiva de métodos analíticos en sistemas automatizados a lo largo de los años. Ya en 1953, cuando Wallace Coulter publicó el *principio de Coulter*, inició una gran revolución tecnológica para la automatización en hematimetría, haciendo posible un recuento automatizado de las células sanguíneas del hemograma (2). En los últimos años, la evolución tecnológica en los analizadores de hematología mediante la incorporación de nuevos principios físicos para el análisis celular y la evolución de los algoritmos en los softwares, ha supuesto una mejora impresionante en la realización del hemograma. En la actualidad, los analizadores de hematología permiten obtener resultados precisos y detectar de manera fiable alteraciones de las poblaciones celulares presentes en sangre periférica, ofreciendo una enorme cantidad de información tanto cuantitativa como cualitativa (3, 4).

Es importante destacar que el hemograma no consiste en una prueba simple, sino que aporta una amplia variedad de magnitudes que reportan resultados de las diferentes poblaciones celulares. Además, requiere de un amplio conocimiento tanto de la metodología analítica utilizada por el analizador, como del significado clínico de los resultados obtenidos, para poder así rentabilizar al máximo toda la información que proporciona y mejorar la asistencia a los pacientes.

En la actualidad, no se está rentabilizando la enorme cantidad de datos que proporcionan los nuevos autoanalizadores disponibles en la realización del hemograma. Es por este motivo, que la presente tesis se basa en el análisis detallado de magnitudes celulares obtenidas en el hemograma, los *Cell Population Data* o CPD, y el papel que pueden tener en el diagnóstico y seguimiento de diferentes patologías.

## **1.2. Tecnología VCSn y obtención de los *Cell Population Data***

Los CPDs son magnitudes morfométricas que aportan información sobre las características celulares de las diferentes poblaciones hematopoyéticas. Los CPDs se obtienen mediante la tecnología utilizada en el procesamiento del hemograma por los analizadores hematológicos. En este sentido, es necesario resaltar que los analizadores hematológicos disponibles en el mercado se basan en diferentes tecnologías, es decir que cada uno de ellos aplica diferentes metodologías para la obtención del hemograma, principalmente en el diferencial leucocitario y la concentración de reticulocitos. Este hecho comporta que determinados CPDs no estén disponibles en todos los analizadores ya que cada uno proporciona sus CPDs específicos, no siendo intercambiables entre ellos. Además, no todos los analizadores ofrecen la posibilidad de acceder a la información que proporcionan los CPDs por parte de los usuarios.

En esta tesis, los CPD estudiados se han obtenido mediante la tecnología VCSn incorporada en la serie de analizadores DxH de Beckman Coulter (Brea, CA, EEUU). La tecnología VCSn aplica tres mediciones físicas para establecer el diferencial leucocitario, así como el recuento de reticulocitos y eritroblastos. Estas mediciones incluyen la impedancia por el principio Coulter, un sondeo electromagnético que proporciona información sobre la conductividad celular, y una dispersión láser en 5 ángulos distintos

(Figura 1). El volumen celular (**V**) obtenido por impedancia mide la altura del pulso provocado por el paso de la célula entre dos electrodos. Cada célula produce un pulso eléctrico proporcional a su volumen, ofreciendo información sobre el tamaño celular. Por otro lado, la conductividad (**C**) por su parte, analiza la composición interna de la célula ofreciendo información sobre la estructura de la cromatina y la relación entre el núcleo y el citoplasma, a través de la señal emitida por un emisor al ser captada por un receptor. La presencia de una relación núcleo/citoplasma elevada o una cromatina nuclear hipercondensada proporcionarían una **C** más baja, comparado con, por ejemplo, una célula con una relación núcleo/citoplasma disminuida o una cromatina laxa e inmadura. Por último, la dispersión de la luz láser (**Sn**) se mide mediante dos sensores ópticos que determinan los 5 ángulos de dispersión, revelando la complejidad celular determinada por dos características citológicas como son la segmentación nuclear y la granulación citoplasmática. Los 5 ángulos de dispersión corresponden a: ángulo de dispersión media **SM** con un detector entre  $9^{\circ}$ - $43^{\circ}$ , ángulo de dispersión baja **SL** con un detector entre  $9^{\circ}$ - $20^{\circ}$ , ángulo de dispersión alta **SU** con un detector entre  $9^{\circ}$ - $20^{\circ}$ , ángulo de dispersión axial **SA** con un detector a  $5^{\circ}$  y a un ángulo de dispersión lateral **AL2** con un detector ubicado a  $0^{\circ}$  (Figura 1).

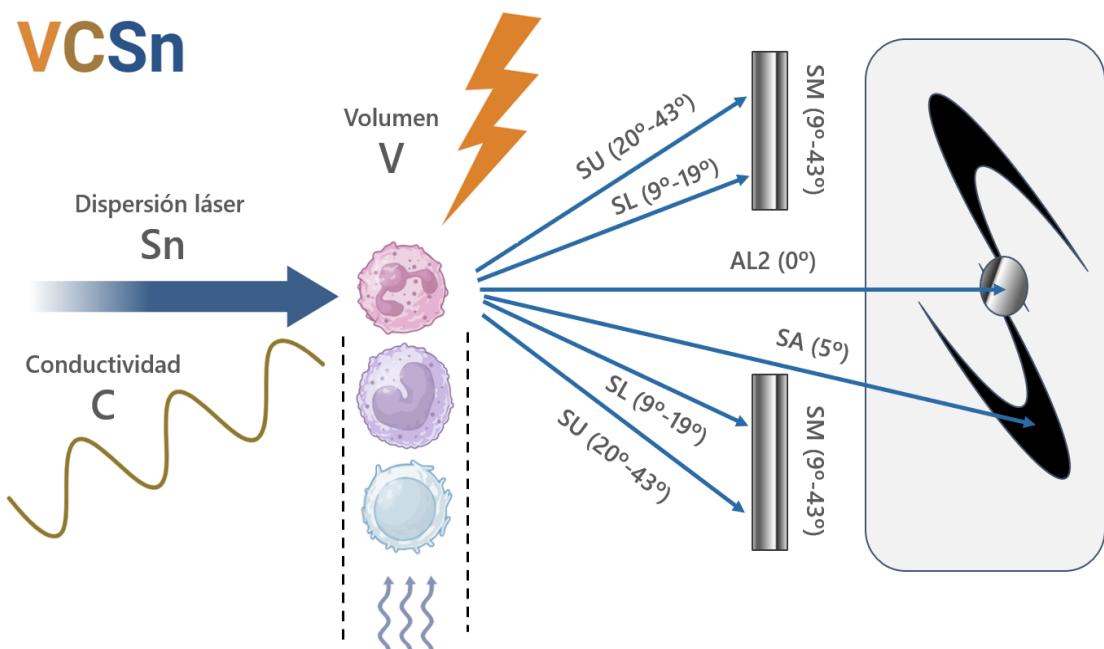


Figura 1. Representación de la tecnología VCSn en el análisis celular para la identificación de las diferentes subpoblaciones leucocitarias en su paso por una célula de flujo.

La caracterización celular a través de los tres principios que componen la tecnología VCSn se realiza en cada célula de manera individual a su paso por una célula de flujo. Este análisis puede llegar a caracterizar a más de 8.000 eventos celulares en pocos segundos. Además, la célula analizada se encuentra en su estado nativo, es decir, no se realizan tinciones que puedan alterar su composición, simulando un entorno celular ideal. Una vez caracterizados los diferentes eventos celulares, el analizador integra los datos obtenidos con algoritmos complejos para definir las diferentes poblaciones celulares en función de las características comunes de cada una de ellas, de esta forma se obtienen los neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos. La información obtenida se traduce en resultados precisos y fiables mostrados en varios gráficos de datos. En la Figura 2 se muestra la representación del diferencial leucocitario (**DIFF**) en varias gráficas de obtención de datos: en 2D, de superficie y en 3D. El gráfico en 2D es el más común y utilizado para la representación de las subpoblaciones leucocitarias, donde el eje Y representa el **V** y el eje X la complejidad **Sn** (el eje Z que correspondería a la **C** en esta gráfica no queda representado). Por su parte, el gráfico de superficie resalta aquellas poblaciones más abundantes en sangre periférica. El gráfico en 3D ofrece una visión tridimensional de la dispersión leucocitaria y permiten visualizar la adquisición de cada evento individual en las coordenadas de la gráfica hasta la composición final de las poblaciones.

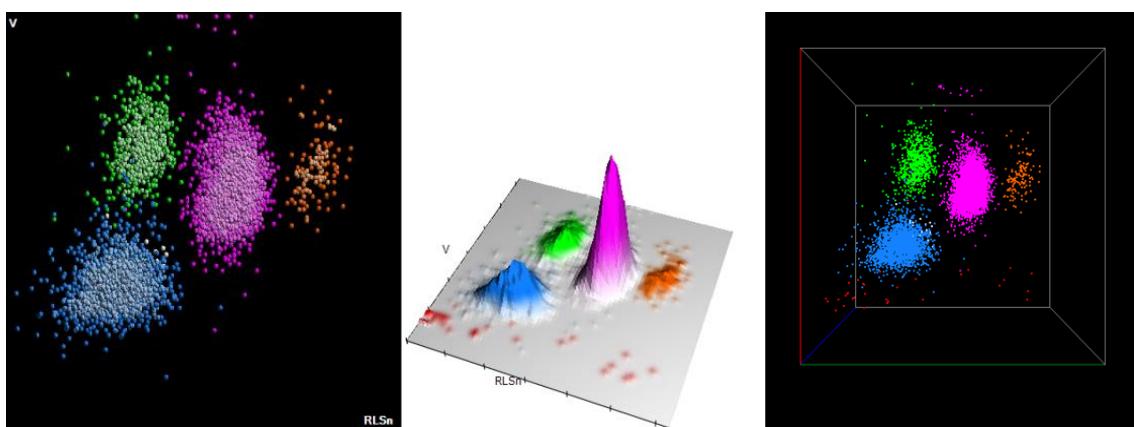


Figura 2. Representación del canal DIFF obtenido en el analizador hematológico Unicel DxH-900 (Beckman Coulter). La población en azul corresponde a los linfocitos, la verde a los monocitos, la rosa a los neutrófilos, la naranja a los eosinófilos y la blanca a los basófilos. En la imagen de la izquierda se representa la gráfica en 2D, en el medio se muestra una gráfica de superficie y a la derecha se muestra el mismo diagrama en 3D.

Esta compleja integración numérica y gráfica permite identificar fácilmente la presencia de células atípicas en sangre periférica, emitiendo el DxH alarmas cualitativas de sospecha de granulocitos inmaduros, blastos o de linfocitos atípicos, entre otros. Estas células atípicas estarán ubicadas en la gráfica **DIFF** en unas coordenadas no esperadas, diferentes a las poblaciones habituales (Figura 3).

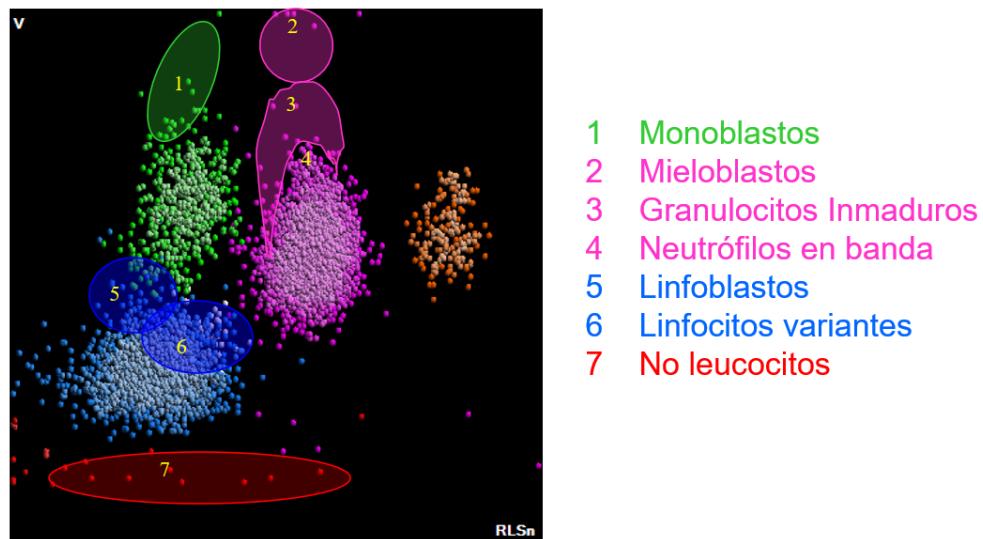


Figura 3: Gráfico del canal DIFF con presencia de células atípicas.

Las distintas poblaciones leucocitarias están caracterizadas por una **media posicional (MN)** y una **desviación estándar (SD)** de cada principio de medida **VCSn**, obteniendo así datos numéricos de 14 CPDs diferentes en cada población. En la Figura 4 se puede observar la representación gráfica de los CPDs en el canal **DIFF**. Los 14 CPDs representan las características celulares de cada población celular y corresponderían a:

- **MN-V:** media del volumen
- **SD-V:** desviación estándar del volumen
- **MN-C:** media de la conductividad
- **SD-C:** desviación estándar de la conductividad
- **MN-SM:** media de dispersión del ángulo medio SM ( $9^{\circ}$ - $43^{\circ}$ )
- **SD-SM:** desviación estándar de dispersión del ángulo medio SM ( $9^{\circ}$ - $43^{\circ}$ )
- **MN-SL:** media de dispersión del ángulo bajo SL ( $9^{\circ}$ - $19^{\circ}$ )

- **SD-SL:** desviación estándar de dispersión del ángulo bajo SL ( $9^0$ - $19^0$ )
- **MN-SU:** media de dispersión del ángulo alto SU ( $20^0$ - $43^0$ )
- **SD-SU** desviación estándar de dispersión del ángulo alto SU ( $20^0$ - $43^0$ )
- **MN-SA:** media de dispersión del ángulo axial SA ( $5^0$ )
- **SD-SA:** desviación estándar de dispersión del ángulo axial SA ( $5^0$ )
- **MN-AL2:** media de dispersión del ángulo lateral AL2 ( $0^0$ )
- **SD-AL2:** desviación estándar de dispersión del ángulo lateral AL2 ( $0^0$ )

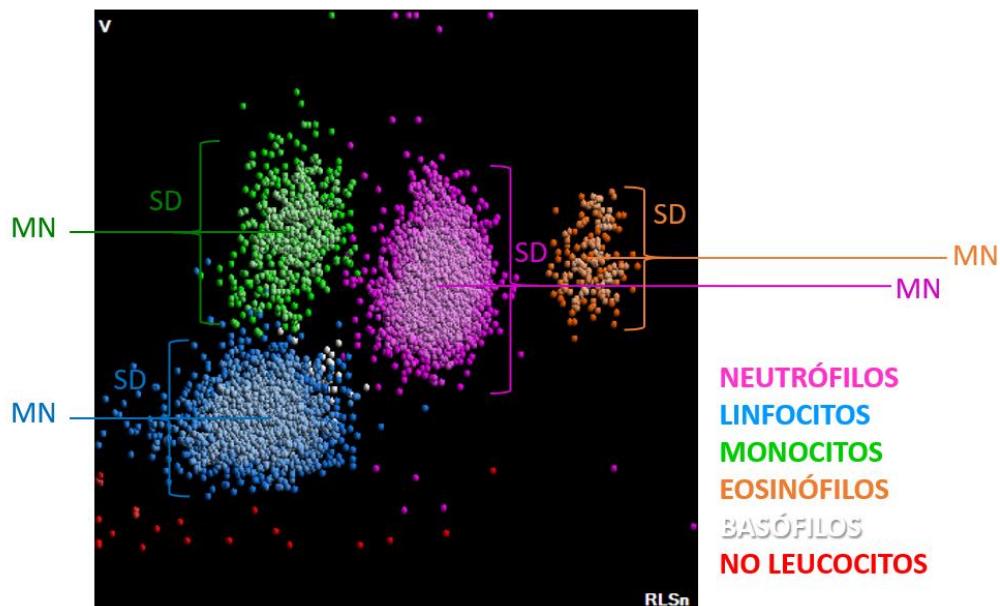


Figura 4: Representación de los CPDs en el canal DIFF.

Cada CPD representa un dato numérico que refleja características celulares pudiendo caracterizar en conjunto a cada población celular. En la Figura 5 se muestran los datos numéricos de los CPDs que ofrece el analizador DxH para las poblaciones leucocitarias en una muestra sin alteraciones. El DxH no puede obtener los CPDs de la población de los basófilos debido a que se encuentran en baja concentración en sangre periférica, representando un porcentaje muy bajo del total de leucocitos analizados. Los CPDs descritos también se obtendrían mediante el mismo procedimiento en la población de eritrocitos y reticulocitos, pero en el canal de procesamiento correspondiente a los reticulocitos (RET).

	NE		LI		MO		EO	
	MN	SD	MN	SD	MN	SD	EO	SD
<b>V</b>	148	16.72	89	14.14	174	17.25	161	16.99
<b>C</b>	150	4.61	120	8.24	127	6.14	152	4.50
<b>SM</b>	149	9.34	71	15.67	88	10.86	203	8.98
<b>SU</b>	148	9.27	70	17.78	98	11.30	214	8.44
<b>SL</b>	145	12.34	65	19.16	74	13.69	188	12.15
<b>SA</b>	191	33.28	37	10.98	90	26.26	191	48.23
<b>AL2</b>	141	12.76	66	12.64	118	18.59	115	10.22

Figura 5: Datos numéricos de los CPDs en las poblaciones leucocitarias.

Los sistemas de análisis de la serie Unicel DxH de Beckman Coulter, son analizadores de hematología automatizados y multiparamétricos para el diagnóstico *in vitro* en los laboratorios clínicos. Esencialmente, los analizadores DxH combinan dos principios metodológicos, la impedancia para la obtención del recuento celular sanguíneo o CBC (siglas en inglés *Cell Blood Count*) y la tecnología VCSn, descrita previamente, para la obtención del diferencial leucocitario, recuento de reticulocitos y determinación de eritroblastos en una célula de flujo (5). Durante esta tesis se han utilizado los analizadores de la serie 800 y 900, **Unicel DxH-800** y **Unicel DxH-900** respectivamente, para el procesamiento de las muestras en los diferentes estudios. Nuestro laboratorio fue el primer centro europeo en realizar la implementación de la nueva serie DxH-900. Esta nueva versión de los analizadores DxH iba encaminada fundamentalmente a mejorar el tiempo de procesamiento de muestras, reducir el tamaño del analizador, disminuir el número de incidencias, así como facilitar la accesibilidad a la revisión del control de calidad y a los mantenimientos de los equipos, haciéndolos en general más ágiles de usar para el usuario. En cuanto a la tecnología utilizada o algoritmos aplicados para la obtención de resultados en las diferentes magnitudes, eran las mismas que en la serie anterior DxH-800, no implementando nuevas mejoras en ese sentido. El procesamiento de las muestras correspondientes a los estudios realizados antes del 2019 se realizó en la serie DxH-800, mientras que los estudios posteriores se procesaron en la serie DxH-900. En un estudio realizado se demuestra que el DxH900 proporciona unos resultados fiables y totalmente comparables a su predecesor, el DxH800, principalmente en

términos de rendimiento analítico (6). DxH900 es un analizador exacto y de alta precisión con buenas prestaciones analíticas para ser utilizado eficazmente en laboratorios de gran volumen.

### **1.3. Posibles aplicaciones clínicas de los *Cell Population Data***

Los CPDs representan, de manera automatizada y cuantitativa, características morfológicas de una población celular específica, como son los eritrocitos, linfocitos, neutrófilos o monocitos, entre otras. De esta manera y en comparación con poblaciones sin alteraciones morfológicas, los CPDs permiten detectar cambios citológicos en el tamaño celular, la estructura nuclear y granulación citoplasmática de los neutrófilos, el citoplasma de los linfocitos o en la heterogeneidad del tamaño de los monocitos. Estas características morfológicas, objetivables mediante los CPDs, indican una respuesta frente a un proceso fisiopatológico específico. En este sentido, el resultado de los CPDs en determinadas poblaciones permitiría incrementar la capacidad diagnóstica y pronostica de algunos procesos clínicos y enfermedades, mejorando así la asistencia a los pacientes. A continuación, se enumeran algunas posibles aplicaciones clínicas que pueden tener los CPDs de determinadas poblaciones celulares.

#### **1.3.1. Diagnóstico diferencial de microcitosis**

La **anemia ferropénica (AF)** y el **rasgo talasémico** representan las dos principales causas de **microcitosis** en nuestro entorno. La **microcitosis** se define por un **volumen corpuscular medio (VCM) inferior a 80 fL** en la población de eritrocitos. La AF es la anemia más frecuente a nivel global, afectando a cerca del 40% de la población mundial, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (7). La AF está presente en todas las regiones, siendo África y Asia Sudoriental las zonas más afectadas y con mayor prevalencia. El aporte de hierro al organismo es fundamental para la síntesis de hemoglobina, iniciándose en el eritroblasto basófilo hasta la maduración de los reticulocitos. El déficit nutricional de hierro afecta a la eritropoyesis, produciendo en una etapa inicial eritrocitos con menor contenido en hemoglobina (hipocromos), seguido de una reducción secuencial en el tamaño (microcíticos) y desarrollando finalmente, si no se trata a tiempo, una disminución de la concentración de hemoglobina y una anemia

ferropénica. Las principales causas de anemia ferropénica son por: a) disminución de la ingesta de hierro, principalmente por una dieta inadecuada, b) aumento de las pérdidas, sobre todo por hemorragias de origen ginecológico y digestivo, c) o bien por un aumento de la demanda de hierro como sucede en el crecimiento, embarazo o la lactancia (8).

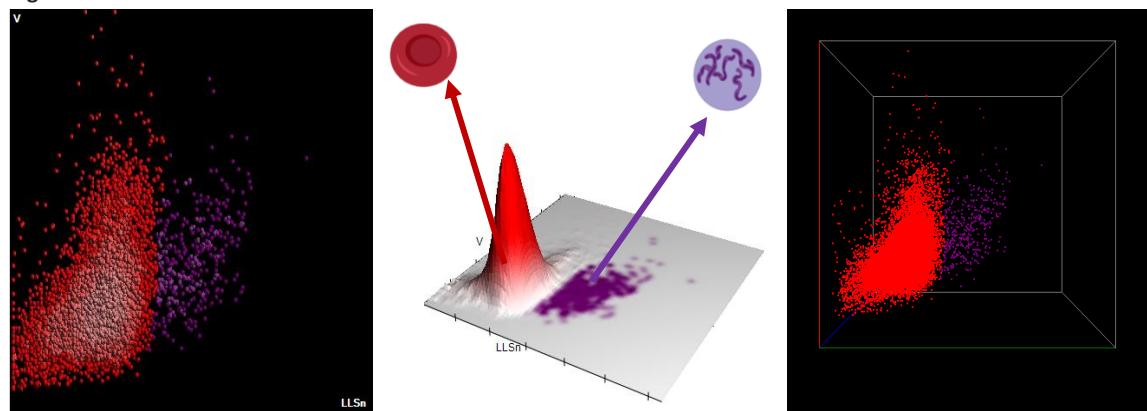
Las **talasemias** por su parte son un conjunto de **enfermedades genéticas** que afectan a los **genes de las cadenas de globina** produciendo una disminución o ausencia en la síntesis de una o más cadenas de globina (9). Esta disminución/ausencia de cadenas de globina produce una reducción de la formación de las hemoglobinas de la cual forman parte, originando un hematíe de menor tamaño (microcítico) y con menor contenido de hemoglobina (hipocromo). Las talasemias presentan una incidencia variable según el área geográfica, siendo frecuentes en países del Mediterráneo, Sudeste de Asia, Oriente Medio, África e India. Desde el punto de vista biológico, las talasemias se clasifican según la cadena de globina afectada (10). De este modo una  $\alpha$  o  $\beta$ -talasemia (mayoritarias) se originaría si la mutación afecta al gen de la  $\alpha$  o  $\beta$  globina respectivamente, pero la mutación también puede afectar a otro tipo de cadena de globina, originando las  $\delta$ ,  $\delta\beta$ ,  $\gamma\delta\beta$  y  $\epsilon\gamma\delta\beta$ -talasemias (menos frecuentes). Además del tipo de cadena afectada, en las talasemias la síntesis de cadena de globina puede estar ausente, representándose como  $\alpha^0$ ,  $\beta^0$ ,  $\delta^0$ , etc. o disminuida como  $\alpha^+$ ,  $\beta^+$ ,  $\delta^+$ , etc. (11).

Es importante poder diferenciar entre AF y talasemia para proporcionar un diagnóstico correcto y un adecuado tratamiento con hierro, con el fin de evitar aporte de hierro innecesario en portadores de talasemia, así como proporcionar un adecuado asesoramiento genético (12). Los índices eritrocitarios publicados por Wintrobe, hace más de 90 años siguen siendo útiles en la clasificación del tipo de anemia (13-17). Desde la aparición de los índices de Wintrobe, se han propuesto varios índices y fórmulas con el objetivo de poder diferenciar entre estas dos entidades de manera precoz y precisa. En los últimos años, la evolución tecnológica que ha tenido lugar en los analizadores automatizados de hematología ha permitido disponer de nuevas magnitudes en el hemograma que intentan mejorar el rendimiento diagnóstico (18). En la actualidad, existen más de 40 índices y/o fórmulas publicadas en la literatura científica con el

objetivo de facilitar el diagnóstico diferencial entre AF y talasemia. Sin embargo, ninguno de ellos ha logrado establecer un rendimiento con una sensibilidad y especificidad cercanas al 100% (18). Es por ello necesario establecer nuevas estrategias para mejorar el rendimiento diagnóstico entre estas dos entidades, pudiendo jugar un papel importante los CPDs.

En este sentido, los **CPDs de serie roja o eritroide**, integrados por los **CPDs de la población de eritrocitos (NonRET)** y los **CPDs de la población de reticulocitos (RET)**, proporcionan información sobre las características morfológicas de ambas poblaciones celulares presentes en sangre periférica, pudiendo tener un papel importante en la diferenciación entre AF y talasemias. Dichos CPDs de serie roja se obtienen en el canal de reticulocitos mediante la tecnología VCSn disponible en los analizadores de la serie DxH de Beckman Coulter. Previo a la adquisición de los resultados, la muestra es teñida con el colorante nuevo azul de metileno para poder detectar los restos de RNA presentes en la población de reticulocitos. En la Figura 6 se muestra la representación del canal de reticulocitos en varias gráficas de obtención de datos: en 2D, de superficie y en 3D. El gráfico en 2D representa las poblaciones de eritrocitos (rojo) y reticulocitos (lila), donde el eje Y representa el **V** y el eje X la complejidad **Sn**. El gráfico de superficie resalta aquellas poblaciones más abundantes en sangre periférica. El gráfico en 3D ofrece una visión tridimensional de la dispersión celular y permite visualizar la adquisición de cada evento individual en las coordenadas de la gráfica hasta la composición final de las poblaciones.

Figura 6.



Representación del canal de reticulocitos obtenido en el analizador hematológico Unicel DxH-900. La población en rojo corresponde a los eritrocitos (NonRET) y la población lila a los reticulocitos (RET). En la imagen de la izquierda se representa la gráfica en 2D mostrando en el eje de coordenadas el volumen celular (V) y en abscisas la complejidad (Sn) celular. En el medio se muestra una gráfica de superficie que refleja la mayor concentración de eritrocitos (rojo) respecto a la concentración de reticulocitos (lila). A la derecha, se muestra el mismo diagrama en 3D añadiendo el eje tridimensional (azul) correspondiente a la conductividad (C), de la tecnología VCSn.

Al igual que en el canal DIFF para la caracterización de las subpoblaciones leucocitarias, la tecnología VCSn combina el volumen (V), la conductividad (C) y la dispersión de la luz láser (Sn) en cinco ángulos diferentes (SM= 9-43°, SU= 20-43°, SL= 9-19°, SA= 5° y AL2=0°) para obtener resultados de la población NonRET y RET en su paso por la célula de flujo. La tecnología VCSn proporciona resultados cuantitativos para cada CPD por media posicional (MN) y desviación estándar (SD) en cada principio (V, C y Sn) y población celular analizada (Figura 7). En la Figura 8 se muestran los resultados cuantitativos obtenidos en una muestra sin alteraciones para los diferentes CPDs en cada población.

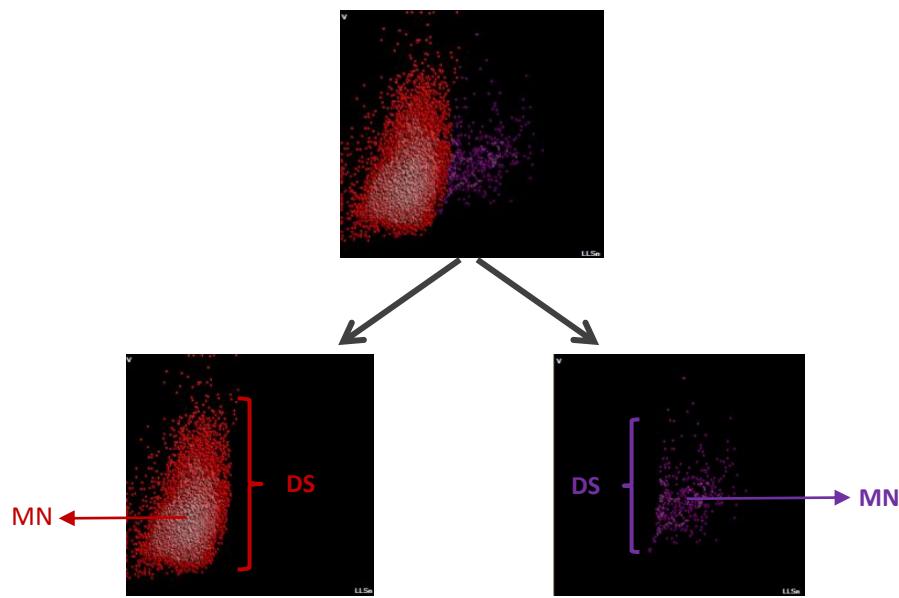


Figura 7. Representación de la media posicional (MN) y desviación estándar (SD) de los CPDs para la población de eritrocitos (rojo) y reticulocitos (lila).

	RET		NonRET	
	MN	SD	MN	SD
<b>V</b>	48	13.74	33	9.63
<b>C</b>	90	20.57	87	19.65
<b>SM</b>	124	20.29	55	13.95
<b>SU</b>	129	18.26	64	14.09
<b>SL</b>	116	24.76	42	14.76
<b>SA</b>	113	28.89	66	11.76
<b>AL2</b>	134	16.51	107	10.03

Figura 8. Datos numéricos (MN y SD) de los CPDs para la población de eritrocitos (NonRET) y reticulocitos (RET).

### 1.3.2. Los Síndromes Mielodisplásicos

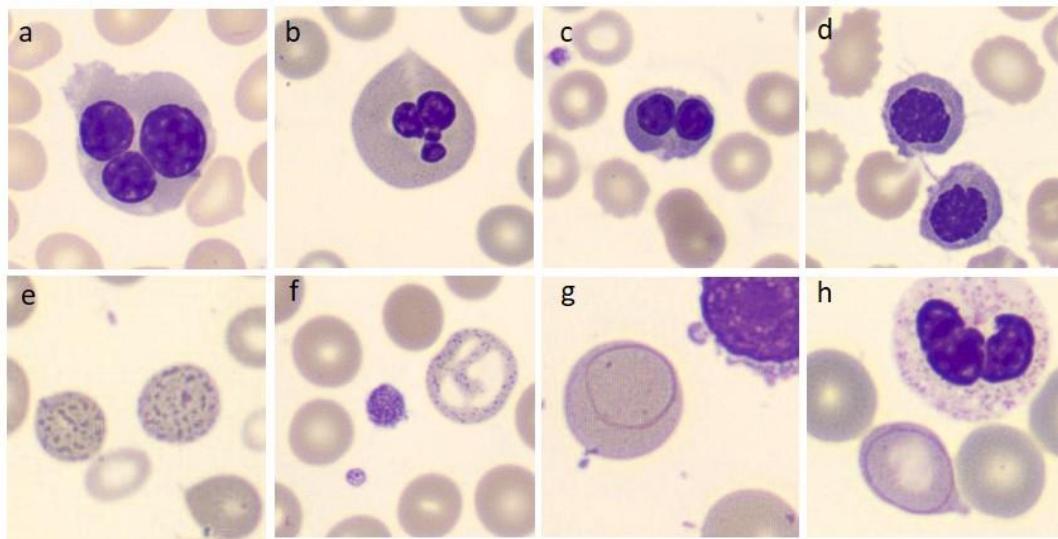
Los **síndromes mielodisplásicos (SMD)** son un grupo heterogéneo de neoplasias hematológicas caracterizadas por una hematopoyesis ineficaz que da lugar a la presencia de **citopenia en sangre periférica** y **displasia morfológica** en una o varias líneas celulares mieloides (19, 20). Los SMD presentan un riesgo incrementado en desarrollar

una leucemia aguda mieloide, confiriendo a estos pacientes un peor pronóstico de la enfermedad (21). La incidencia de los SMD en la población general es de alrededor de 5 casos por 100.000 habitantes al año. Se trata de una hemopatía que predomina principalmente en personas de edad avanzada con una mediana de edad al diagnóstico de 70 años y con el 25% de los pacientes diagnosticados con más de 80 años. El hecho que el número de casos diagnosticados de SMD aumente con los años se debe al aumento de la esperanza de vida de la población y a la mejoría de la supervivencia de los pacientes con SMD debido al uso de nuevos tratamientos (22, 23). El diagnóstico final y la evaluación del riesgo requiere conocimiento de datos clínicos, analíticos, morfológicos, inmunofenotípicos, histológicos, citogenéticos, y moleculares, realizándose de forma integrada (24, 25).

El hemograma es una de las pruebas más solicitadas en el laboratorio clínico y su interpretación constituye el primer hallazgo en la sospecha de diferentes hemopatías, siendo importante en la detección de citopenias en los SMD. Los SMD suelen iniciar su presentación en sangre periférica a partir de una anemia macrocítica y en ocasiones con neutropenia y/o trombocitopenia asociada. Las citopenias en sangre periférica son consecuencia de un aumento en el grado de apoptosis celular a nivel medular produciendo una hematopoyesis ineficaz. Dichas citopenias clonales en los SMD vienen definidas por: una concentración de **hemoglobina < 10 g/dL**, un recuento de **neutrófilos absolutos < 1,8 x 10<sup>9</sup>/L** y/o un recuento de **plaquetas < 100 x 10<sup>9</sup>/L**, según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre neoplasias mieloides (24, 25). Valores por encima de estos límites no excluyen el diagnóstico de un SMD siempre y cuando haya presencia de alteraciones displásicas y/o citogenéticas.

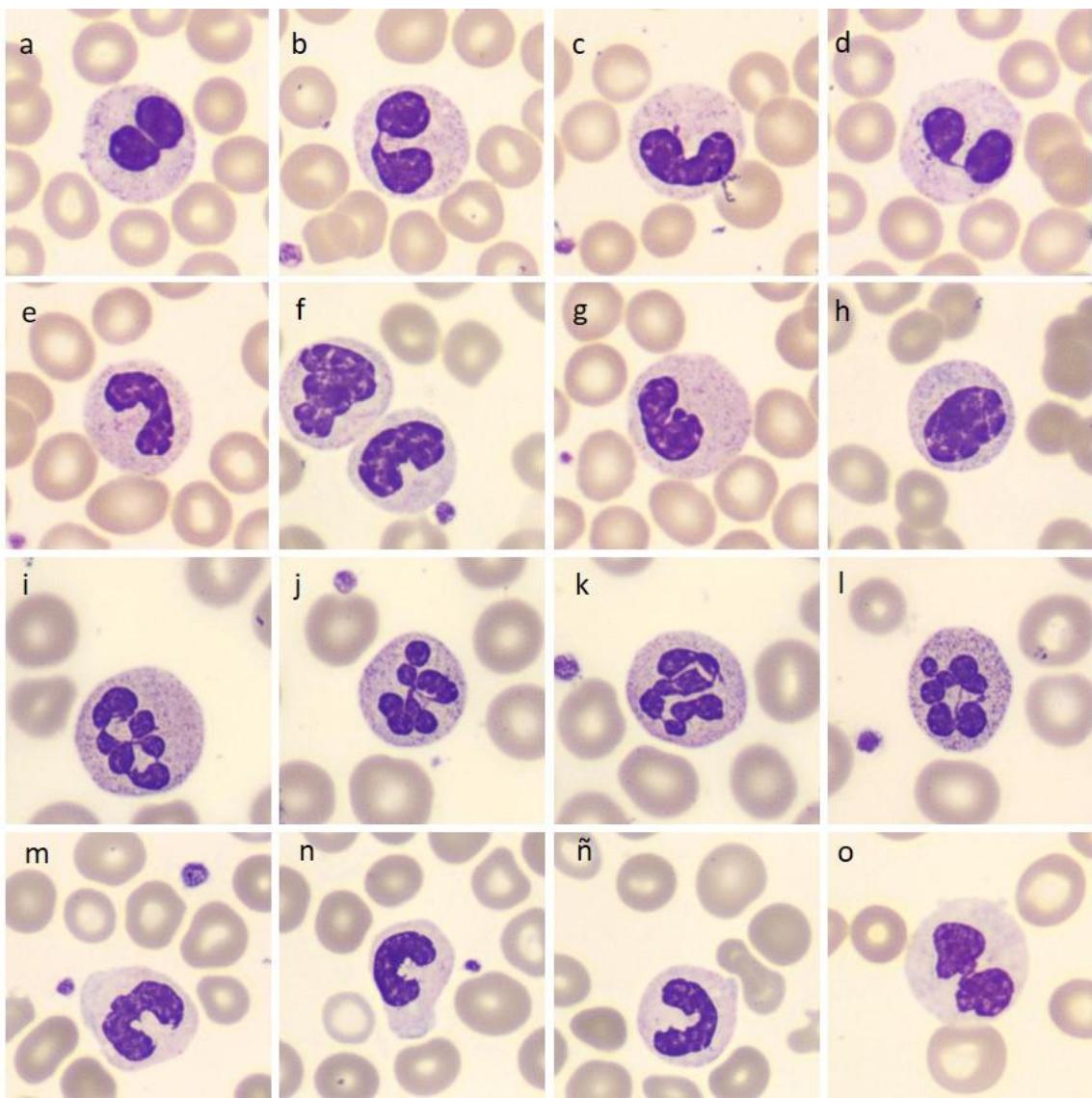
Junto con el hemograma, la revisión morfológica de la extensión de sangre periférica (y posterior de médula ósea) es una prueba fundamental en la detección de los SMD. Una minuciosa observación morfológica permite la detección de signos displásicos, hecho que constituye un criterio para el diagnóstico de SMD. En la observación morfológica podemos encontrar diversos tipos de alteraciones dismórficas que pueden afectar a una o varias líneas hematológicas. A continuación, se exponen las principales dismorfias constitutivas de displasia según la línea celular afectada (26):

**Diseritropoyesis** (displasia de la serie eritroide): hematíes con punteado basófilo, anillos de Cabot, distribución anómala de la hemoglobina o cuerpos de Howell-Jolly. Eritroblastos con presencia de puentes internucleares, bi y multinuclearidad megaloblastosis, mitosis anómalas, irregularidad del perfil nuclear, vacuolización, cariorexis. Presencia de sideroblastos en anillo (Figura 9).



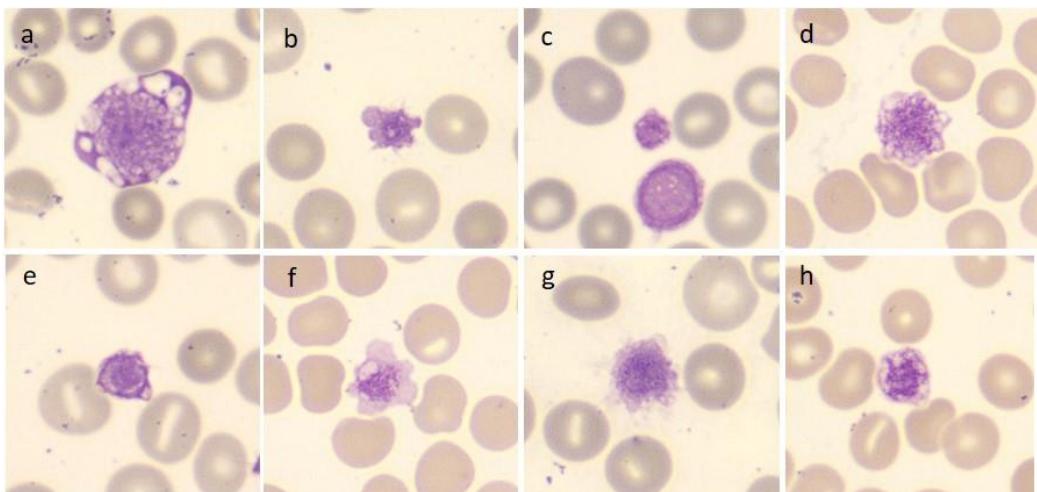
**Figura 9. Observación morfológica del frotis de sangre periférica con diferentes signos de displasia eritrocitaria: eritroblastos bi y multinucleados (a-c), eritroblastos con presencia de puente internuclear (d), eritrocitos con punteado basófilo (e) y distribución anómala de la hemoglobina (f), eritrocitos con anillos de Cabot (g y h).**

- ✓ **Disgranulopoyesis** (displasia de la serie granulocítica): alteraciones del núcleo como hiposegmentación pseudo-Pelger, hipersegmentación, núcleo en anillo, en espejo o hipercdensación anómala de la cromatina. Alteraciones en la granulación como hipo/desgranulación del citoplasma o presencia de gránulos pseudo-Chediak. La combinación de varias dismorfias, principalmente un neutrófilo hiposegmentado con desgranulación citoplasmática, hace aún más sugestivo el diagnóstico de SMD (Figura 10).



**Figura 10. Observación morfológica del frotis de sangre periférica con diferentes signos de displasia granulocítica: neutrófilos hipolobulados con formas pseudo-Pelger (a-d), neutrófilos con hipercondensación anómala de la cromatina (e-h), neutrófilos hipersegmentados (i-l), neutrófilos con desgranulación del citoplasma (m-o).**

- ✓ **Dismegacariopoyesis** (displasia de la serie plaquetar). Plaquetas gigantes, hipogranuladas, hipergranuladas, vacuoladas o con presencia de pseudo-núcleo (centralización organelas). Megacariocitos monolobulados, de varios tamaños, con asincronismo madurativo o con núcleos dispersos (Figura 11).



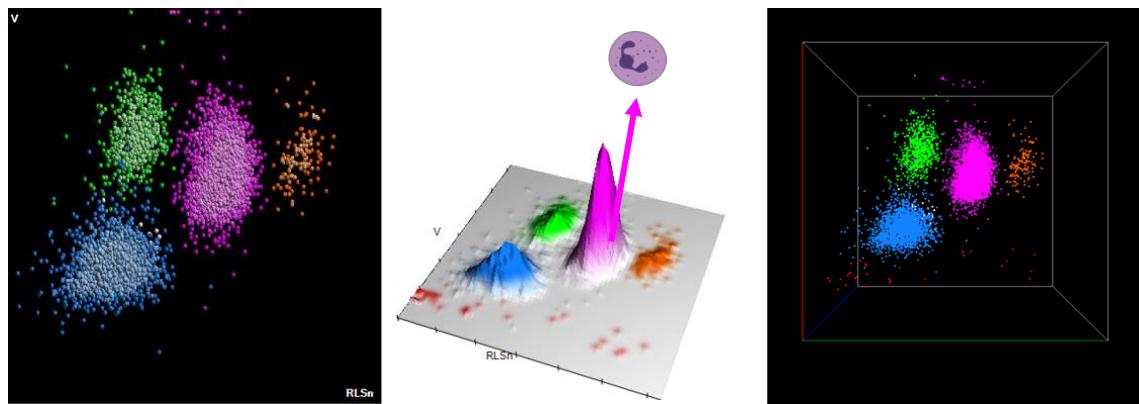
**Figura 11. Observación morfológica del frotis en sangre periférica con diferentes signos de displasia plaquetar: plaqueta gigante (a), plaquetas hipogranuladas (b, c y f), plaquetas con presencia de pseudo-nucleo (c, e, f y g), plaquetas con vacuolas (a, d y h).**

Uno de los principales retos en el diagnóstico inicial de los SMD es descartar aquellas causas reactivas que pueden cursar con citopenias y/o displasia. Para definir la presencia de displasia en una línea celular se establece que debe existir al menos un 10% de elementos displásicos (24, 25). A pesar de este umbral, es importante tener en cuenta que la presencia de displasia por sí sola no implica específicamente la presencia de un SMD y que existen otras causas que también cursan con displasia y que se deben descartar ante la sospecha de un SMD. Algunos factores nutricionales y tóxicos pueden causar citopenias y alteraciones displásicas, siendo necesario descartar previamente un déficit de vitamina B12, folato, hierro, cobre y la exposición a metales como el arsénico o el zinc. Algunas infecciones víricas, como las producidas por el parvovirus B19, procesos inflamatorios o enfermedades autoinmunes y determinados fármacos también pueden ser responsables de mielodisplasia. También, antibióticos como el cotrimoxazol o inmunosupresores como el micofenolato de mofetilo, pueden generar marcada hiposegmentación en los neutrófilos (26, 27). Además de las causas secundarias descritas anteriormente, es importante tener presente la realización de una extensión y una tinción de calidad para que la valoración del grado de displasia sea fiable. Una incorrecta preparación puede llevar a una malinterpretación de diferentes signos de displasia, especialmente de la granulación citoplasmática en los neutrófilos (28).

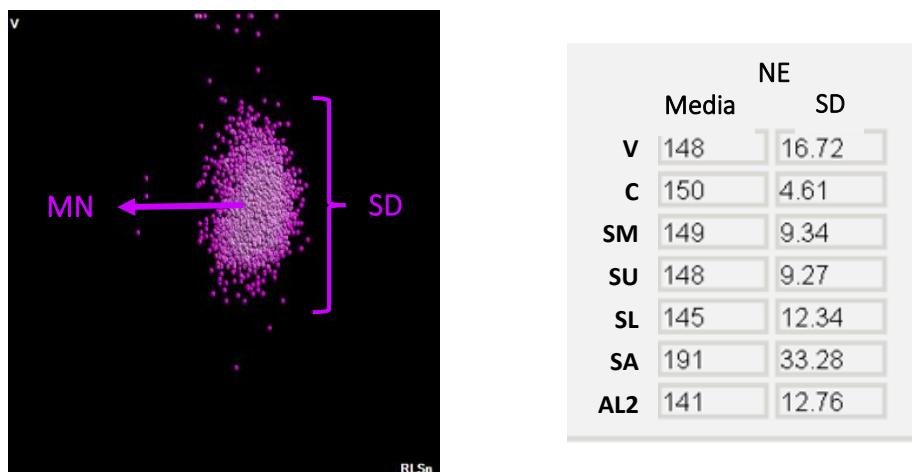
En la actualidad, el reconocimiento de displasia es crucial en el diagnóstico y clasificación de los SMD. A pesar de ello, la identificación de displasia mediante la revisión al microscopio requiere una gran experiencia por parte del observador y no está ausente de cierta subjetividad presentando una elevada variabilidad interobservador, que en ocasiones puede dificultar la detección precoz de SMD (29, 30).

En resumen, la detección de citopenias y la identificación de displasia son dos requisitos claves para el diagnóstico inicial de SMD. El hemograma juega un papel clave ofreciendo unos resultados cuantitativos reproducibles de los elementos celulares, identificando así la presencia de citopenia. Por otro lado, a pesar que la revisión del frotis es clave para la identificación de displasia, sería necesario disponer de nuevas magnitudes, automatizadas y reproducibles, que permitieran mejorar la detección de displasia de manera fiable, sin depender de la variabilidad del observador.

En este sentido, los **CPDs de la población de neutrófilos** podrían tener un papel clave en la detección de disgranulopoyesis, pudiendo cuantificar de manera objetiva la presencia de displasia en los neutrófilos y mejorar así la detección precoz de SMD. Los CPDs de la población de neutrófilos se obtienen en el canal diferencial (DIFF) mediante la tecnología VCSn disponible en los analizadores de la serie DxH de Beckman Coulter. Las características morfológicas que presenta la población de neutrófilos le confieren unas propiedades específicas que son evaluadas mediante los principios físicos que componen la tecnología VCSn. De esta forma, la tecnología VCSn combina el volumen (V); mediante el principio de impedancia para informar sobre el tamaño de los neutrófilos, la conductividad (C); mediante un sondeo electromagnético que informa sobre la estructura interna de los neutrófilos (relación núcleo/citoplasma) y del núcleo (condensación cromatina); y finalmente la dispersión de la luz láser (Sn) en cinco ángulos diferentes, SM (9-43°), SU (20-43°), SL (9-19°), SA (5°) y AL2 (0°) para obtener las características de complejidad celular como la granulación citoplasmática y la segmentación nuclear, en su paso por la célula de flujo (Figura 12). Los CPDs proporcionan resultados cuantitativos por media posicional (MN) y desviación estándar (SD) de cada principio (V, C y Sn) para la población de neutrófilos (Figura 13).



**Figura 12.** Representación de la población de neutrófilos del canal DIFF obtenido en el analizador hematológico Unicel DxH-900 (Beckman Coulter). La población en rosa corresponde a los neutrófilos. En la imagen de la izquierda se representa la gráfica en 2D mostrando en el eje de coordenadas el volumen celular (V) y en abscisas la complejidad (Sn). En el medio se muestra una gráfica de superficie que refleja la concentración de neutrófilos (rosa) respecto a otras poblaciones celulares. A la derecha, se muestra el mismo diagrama en 3D añadiendo el eje tridimensional (azul) correspondiente a la conductividad (C), de la tecnología VCSn.



**Figura 13.** Representación gráfica (izquierda) y numérica(derecha) de la MN y DS correspondientes a los CPDs de la población de neutrófilos (rosa). NE= neutrófilos, V= volumen, C= conductividad, SM= 9-43°, SU= 20-43°, SL= 9-19°, SA= 5° y AL2=0°.

### **1.3.3. La Sepsis y la importancia de su detección precoz.**

En la actualidad la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que la sepsis es un problema global de salud pública debido a la elevada morbilidad y mortalidad que presenta. Afecta entre 47-50 millones de casos cada año y supone cerca de 11 millones de muertes anuales (31). En nuestro entorno, la sepsis tiene una incidencia de aproximadamente unos 200 casos por 100.000 habitantes al año, con una tasa de mortalidad entre el 15-20 %, llegando al 40-50 % en los casos de shock séptico (32). A pesar de los avances terapéuticos de la medicina, la sepsis continúa siendo un problema sanitario de gran envergadura, no solo por la morbilidad y mortalidad que se asocian con ella, sino también, por el consumo de recursos y el elevado coste sanitario que conlleva. Se estima que la sepsis supone el 5,2% del coste sanitario (33). Más de la mitad de los casos de sepsis provienen de infecciones adquiridas en la comunidad que acuden a los servicios de urgencias hospitalarios, siendo el servicio de urgencias el lugar clave para su identificación temprana. Aproximadamente el 60% de los casos de shock séptico que acaban en los servicios de UCI provienen de urgencias (33). La detección precoz de la sepsis es fundamental para establecer un tratamiento adecuado a tiempo, disminuir así las posibles complicaciones derivadas y en última instancia evitar la muerte del paciente. Cada retraso en la identificación de la sepsis supone un incremento exponencial en la morbilidad y mortalidad para el paciente (34, 35). Sus manifestaciones clínicas son muy heterogéneas, siendo en ocasiones poco evidentes, dificultando su diagnóstico y manejo clínico. Por todo ello, es importante establecer estrategias adecuadas y disponer de herramientas que faciliten la identificación temprana de la sepsis para favorecer su resolución final (36, 37).

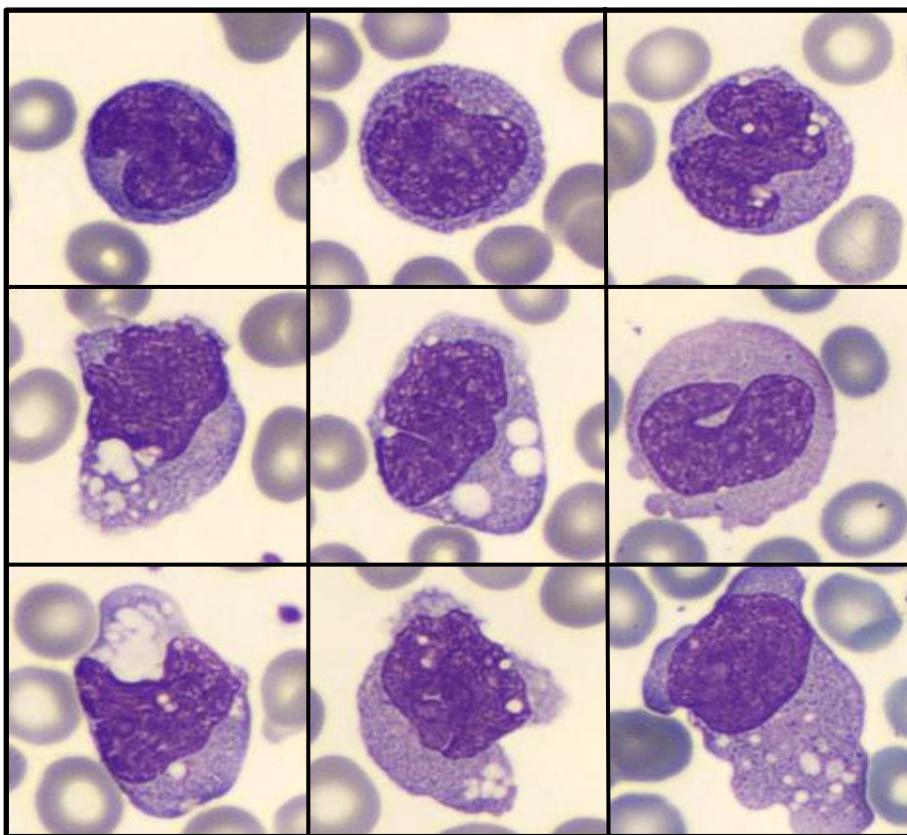
El Tercer Consenso Internacional para la definición de Sepsis y Shock Séptico (SEPSIS-3) celebrado en 2016, definió a la sepsis como una disfunción orgánica potencialmente mortal, causada por una desregulación exagerada del huésped en respuesta a una infección (38). Esta nueva definición supuso un cambio conceptual y de escenario evidente. Se remplazó la escala clínica del Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS, por sus siglas en inglés), utilizada hasta el momento en la clasificación de SEPSIS-2 (39) y única que tiene en cuenta una variable del laboratorio como el recuento total de

leucocitos (LEU), por la escala clínica sintetizada qSOFA (quick Sequential Organ Failure Assessment) y SOFA. Este nuevo paradigma no estuvo exento de controversia al observar en posteriores estudios las diferencias en cuanto a sensibilidad y especificidad que mostraban las diferentes escalas clínicas (40, 41). A pesar de la mejora en la identificación precoz de sepsis, ninguna de las escalas clínicas utilizadas actualmente presenta la sensibilidad y especificidad suficientes para utilizarse de manera aislada en la detección de la sepsis (42). Junto al qSOFA, SIRS y SOFA, en los últimos años han aparecido nuevas escalas clínicas para intentar mejorar la identificación de sepsis, no exentas de limitaciones. En este sentido, en la actualidad no existe un consenso claro sobre qué escala o combinaciones de ellas utilizar en el abordaje de la sepsis. Por ello, con el objetivo de aumentar el rendimiento de las herramientas disponibles hasta el momento, se están estudiando combinaciones entre escalas clínicas fáciles de obtener y diferentes biomarcadores de laboratorio, algunos ya contrastados y otros de prometedores (32).

Fisiopatológicamente, la sepsis desencadena una respuesta hiperinflamatoria exagerada con un aumento en la síntesis y secreción de moléculas proinflamatorias, seguida de una fase de inmunodepresión que agrava la situación clínica y que, si no queda compensada, conlleva un daño orgánico grave (43). En los últimos años, se han descrito más de 170 biomarcadores relacionados con la sepsis, con la idea de mejorar el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad, pero ninguno de ellos presenta un rendimiento diagnóstico suficientemente alto para su uso clínico. En la actualidad, los biomarcadores más aceptados son la proteína C reactiva (PCR) y la procalcitonina (PCT), con las importantes limitaciones que presenta su interpretación, especialmente en cuanto a su baja especificidad para la detección de la sepsis (44). Las guías clínicas únicamente recogen el uso de la PCT en el inicio del tratamiento antibiótico o bien para discontinuarlo, con una baja evidencia de recomendación (42), siendo necesarios estudios clínicos donde participe el laboratorio para poner en valor algunas de los prometedores biomarcadores disponibles.

Los monocitos desempeñan un papel importante en la aparición y desarrollo de la sepsis, participando como mediadores (tanto en la inmunidad innata como en la adquirida) en las fases hiperinflamatoria e inmunodepresora. Durante la sepsis, se sintetizan varias

subpoblaciones de monocitos que muestran diferente variabilidad en su distribución y una elevada heterogeneidad funcional. Estas características hacen que la población de monocitos presente diferencias en el tamaño celular como se puede observar en la Figura 14. En este sentido, magnitudes relacionadas con los **CPDs de la población de monocitos**, pueden cuantificar de manera objetiva esta variabilidad morfológica en los monocitos, pudiendo constituir indicadores temprano de sepsis. Gracias a la tecnología VCSn disponible en los analizadores Unicel DxH-900 de Beckman Coulter, esta variación en el tamaño de la población de monocitos se puede cuantificar de manera objetiva mediante el CPD que representa la desviación estándar (SD) del volumen (V) en la población de monocitos (**SD-V-MO**). El CPD **SD-V-MO**, mejor conocido como **MDW** (por sus siglas en inglés, **Monocyte Distribution Width**) representa la amplitud de la distribución de monocitos y se ha postulado en los últimos años como un importante biomarcador para la detección precoz de sepsis. El MDW se calcula a través de un algoritmo interno en el analizador DxH-900 que permite obtener un eje extendido para la medición del volumen celular en la tecnología VCSn. Este eje extendido utiliza 512 canales de resolución comparados con los 256 canales del gráfico estándar para el diferencial leucocitario de las 5 subpoblaciones (DIFF). El rango de volumen extendido permite que las poblaciones de monocitos con volúmenes celulares que exceden el rango de medición del DIFF estándar, se desarrolle completamente para que se pueda calcular una desviación estándar precisa del volumen de monocitos y así obtener el MDW (Figura 15).

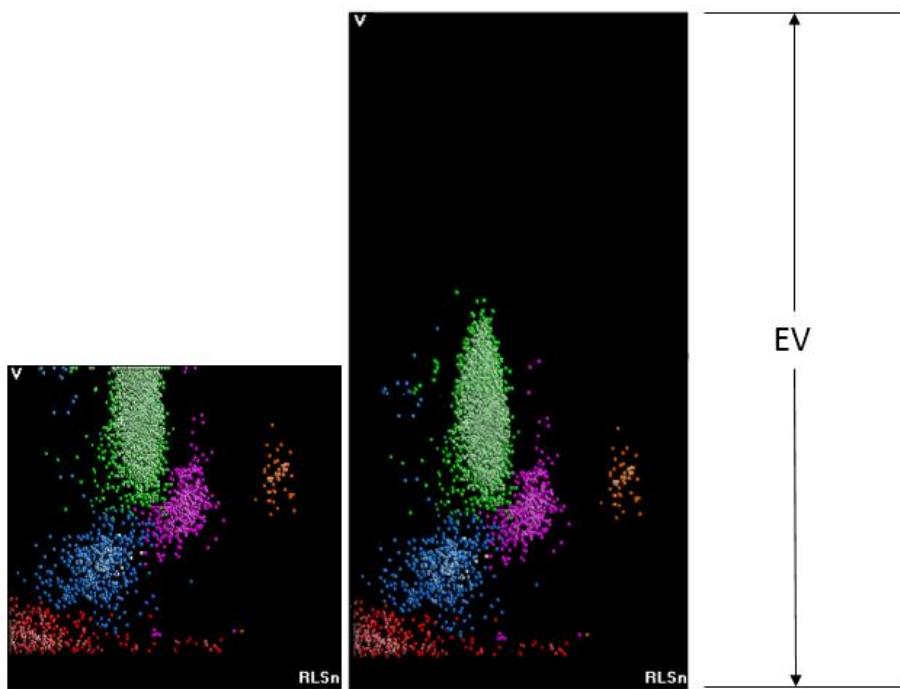


**Figura 14. Imágenes de sangre periférica obtenidas por microscopia digital que reflejan la heterogeneidad del tamaño celular en la población de monocitos durante la sepsis.**

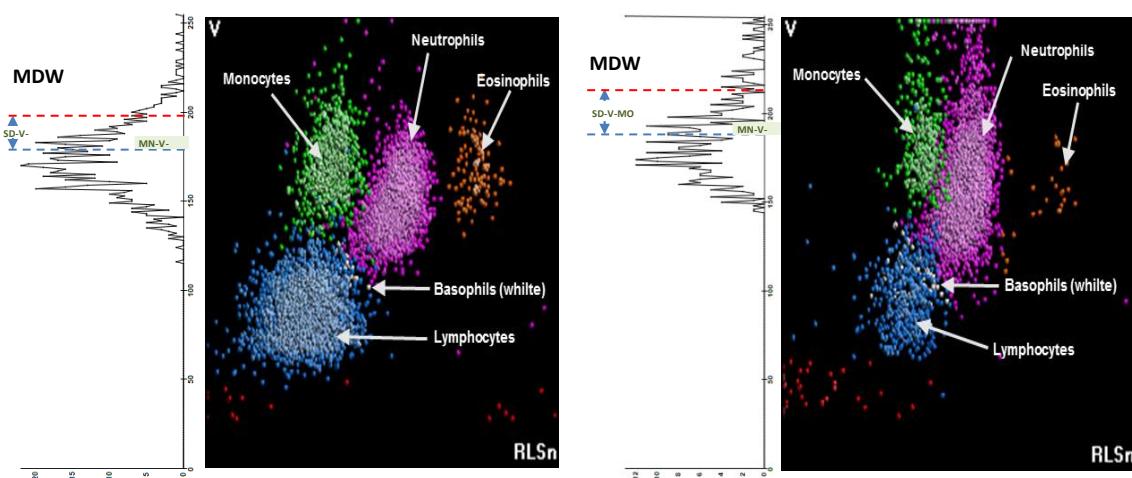
El MDW, además de disponer como el resto de CPDs del control de la calidad COULTER LATRON CP-X látex para el seguimiento de la tecnología VCSn, también dispone de un control de calidad interno cuantificado y valorado en el COULTER 6C Plus Cell Control. En la Figura 16 se puede observar la diferencia del MDW entre un paciente con sepsis y un paciente no séptico (45).

Dos estudios realizados en Estados Unidos demostraron en cerca de 3.000 pacientes que acudieron al servicio de urgencias el buen rendimiento del MDW como indicador precoz de sepsis (45, 46). Ambos estudios evaluaron el MDW en tubos con anticoagulante EDTAK2, obteniendo un valor de 20,0 como punto de corte para un diagnóstico óptimo. El ácido etilendiaminotetraacético o EDTA es el anticoagulante de elección para la determinación del hemograma. Principalmente, el EDTA se presenta en los tubos de

sangre como sales dipotásicas (K2) y tripotásicas (K3). Se ha descrito que la concentración de sal de potasio puede afectar a la precisión del conteo de células sanguíneas, al tamaño de las células y probablemente a su estabilidad. Estos efectos son más marcados en EDTAK3 que en EDTAK2, siendo necesario realizar una validación clínica para el MDW en tubos con EDTAK3.



**Figura 15.** Gráfico estándar del diferencial de las 5 subpoblaciones leucocitarias (imagen izquierda). Gráfico extendido que muestra la extensión del volumen (EV) para obtener un cálculo preciso del MDW (imagen derecha).



**Figura 16.** Representación gráfica del diferencial de las 5 subpoblaciones leucocitarias y la obtención del MDW. A la izquierda se observa un paciente sin sepsis con un MDW de 18,7. A la derecha, destaca un aumento de la amplitud en la población de monocitos con un MDW de 24,6 correspondiendo a un paciente con sepsis (52).

El brote del virus SARS-CoV-2 fue declarado pandemia mundial por la enfermedad COVID-19 el 11 de marzo de 2020 por la OMS. Desde entonces, se han infectado más de 760 millones de personas y se han producido casi 7 millones de muertes. La COVID-19 se puede presentar con una forma leve de infección de las vías respiratorias superiores o sin síntomas en la mayoría de los individuos. Un subgrupo de pacientes, normalmente de edad avanzada o con enfermedades preexistentes como hipertensión, diabetes, enfermedad pulmonar obstructiva crónica o enfermedades cardiovasculares, puede evolucionar a una enfermedad grave y crítica con insuficiencia respiratoria hipoxica, síndrome de dificultad respiratoria aguda con fallo multiorgánico y, en ocasiones, a la muerte (47). Se ha descubierto que el virus SARS-CoV-2 infecta monocitos, macrófagos y células dendríticas, induciendo cambios fenotípicos morfológicos relacionados con la inflamación en los monocitos de sangre periférica (48). En la COVID19, al igual que ocurre en la sepsis, se produce una reacción exagerada del sistema inmunitario frente la infección, activándose una reacción hiperinflamatoria conocida como tormenta de citocinas. En este escenario, el MDW podría tener un importante papel para la detección precoz de pacientes con COVID19 y en su evaluación de la gravedad.

En resumen, la aparición de nuevos biomarcadores celulares relacionados con los monocitos, especialmente el MDW, podría mejorar la detección precoz y el pronóstico de los pacientes con sepsis, así como de pacientes con COVID19.

## **2. HIPOTESIS**

La **hipótesis general** de la presente tesis doctoral es que el estudio de las magnitudes hematimétricas **Cell Population Data**, proporcionadas por los analizadores DxH y obtenidas en el procesamiento del hemograma, puede ser útil para detectar cambios morfológicos precoces de diferentes poblaciones celulares, contribuyendo a mejorar el diagnóstico de determinadas patologías, tanto hematológicas, como los síndromes mielodisplásicos, como no hematológicas, como la detección precoz de sepsis o bien el diagnóstico diferencial de las anemias.

A partir de la hipótesis general, se formularon tres hipótesis concretas:

1. Los **CPDs** de las poblaciones de **eritrocitos** y **reticulocitos** podrían mejorar el diagnóstico diferencial entre las dos principales causas de microcitosis, la anemia ferropénica y la talasemia.
2. Los **CPDs** de la población de **neutrófilos** podrían valorar cuantitativamente los cambios displásicos presentes en los neutrófilos de pacientes con diagnóstico de síndrome mielodisplásico (SMD), un grupo de neoplasias hematológicas que cursan con citopenias periféricas y displasia, y así constituir una herramienta diagnóstica para identificar precozmente pacientes con SMD.
3. El incremento del MDW, **CPD** que refleja la variación del tamaño de la población de **monocitos**, podría estar relacionado con la aparición de sepsis y constituir un biomarcador precoz para su detección, tanto en pacientes que acuden a urgencias como en ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos.

## **3. OBJETIVOS**

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, a continuación, se detallan los objetivos de la presente Tesis Doctoral:

### **3.1. Objetivo principal**

Estudiar el valor de las nuevas magnitudes *Cell Population Data* (CPDs) proporcionadas por los analizadores DxH de Beckman Coulter, obtenidas en el procesamiento del hemograma, en el diagnóstico precoz de pacientes con enfermedades hematológicas, como los síndromes mielodisplásicos, así como en enfermedades no hematológicas, como en la identificación temprana de la sepsis o en el diagnóstico diferencial de las anemias.

### **3.2. Objetivos secundarios**

- 1.** Analizar las diferencias de los CPDs de serie roja en pacientes con microcitosis y pacientes sin microcitosis, así como evaluar el rendimiento diagnóstico de los CPDs de la población de eritrocitos y reticulocitos en el diagnóstico diferencial entre anemia ferropénica y  $\beta$ -talasemia.
- 2.** Estudiar la correlación entre los valores de CPDs de la población de neutrófilos y la detección de displasia granulocítica detectada en la revisión del frotis de sangre periférica. Así como analizar las diferencias de los CPDs de la población de neutrófilos en pacientes con diagnóstico de SMD y sujetos normales, y evaluar la utilidad clínica de los CPDs en el diagnóstico diferencial de pacientes con SMD respecto otras citopenias no clonales.
- 3.** Evaluar el rendimiento de los CPDs de la población de monocitos en la detección temprana de sepsis en pacientes que acuden a urgencias y pacientes que ingresan en la UCI.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

El desarrollo del presente proyecto de tesis se fundamenta en la posible utilidad y aplicación clínica de las magnitudes CPDs de distintas poblaciones celulares en enfermedades hematológicas y no hematológicas. Para llevar a cabo el proyecto de tesis, se han diseñado 3 trabajos de investigación donde en cada uno de ellos se analiza específicamente el papel de determinados CPDs celulares. En total, se han analizado el papel que tienen los CPDs de cuatro poblaciones celulares: eritrocitos, reticulocitos, neutrófilos y monocitos.

El primero trabajo, titulado **“Estudio de los Cell Population Data de serie roja en el diagnóstico diferencial de las microcitosis”**, pretende dar respuesta al primer objetivo específico de la tesis y se basa en el estudio de los CPDs tanto de la población de eritrocitos como de reticulocitos y el análisis de su rendimiento en el diagnóstico diferencial de las principales anemias que cursan con microcitosis, la anemia ferropénica y la talasemia.

El segundo trabajo, titulado **“Evaluación de los Cell Population Data de la población de neutrófilos en el diagnóstico de los Síndromes Mielodisplásicos”**, pretende dar respuesta al segundo objetivo específico de la tesis: estudiar los CPDs de los neutrófilos en pacientes con SMD y sujetos normales, evaluar su utilidad clínica en el diagnóstico diferencial de pacientes con SMD respecto otras citopenias no clonales y estudiar la correlación entre los valores de CPDs y la detección citológica de disgranulopoyesis detectada en la revisión del frotis de sangre periférica. Para llevarlo a cabo, este segundo trabajo está constituido a su vez por 3 estudios diferentes:

- ✓ **Estudio 2.1.** Valoración de los Cell Population Data en pacientes con Síndrome Mielodisplásico.
- ✓ **Estudio 2.2.** Distinción entre SMD y citopenias no clonales mediante el estudio de CPDs.
- ✓ **Estudio 2.3.** Detección de disgranulopoyesis: utilidad de los CPDs en el estudio de la población de neutrófilos.

Finalmente, el tercer trabajo titulado **“Evaluacion de los Cell Population Data de la población de monocitos en el diagnóstico precoz de sepsis”** se diseñó para estudiar el papel que podría tener la población de monocitos en la sepsis y así dar respuesta al tercer objetivo específico de la tesis. Evaluar el rendimiento de los CPDs de monocitos en la detección precoz de sepsis en pacientes que acuden a urgencias y en pacientes que ingresan en la UCI, así como su comportamiento en la COVID19. Para llevar a cabo el tercer trabajo, también se diseñaron 3 estudios específicos:

- ✓ **Estudio 3.1.** Evaluación del MDW en el diagnóstico precoz de sepsis en pacientes que acuden a urgencias.
- ✓ **Estudio 3.2.** Utilidad del MDW en el diagnóstico y pronóstico de pacientes con sepsis que ingresan en UCI.
- ✓ **Estudio 3.3.** Eficacia del MDW como biomarcador de cribado en la identificación de pacientes con COVID19 que acuden a urgencias.

Para asegurar la fiabilidad de los resultados obtenidos en las magnitudes analizadas en los diferentes estudios de la tesis, diariamente se procesaron los controles de calidad analíticos **COULTER 6C Plus Cell**, **COULTER Retic-X** y **COULTER Latron CP-X**. El primero de ellos, **COULTER 6C Plus Cell** es un control analítico a tres niveles de concentración diferente que permite revisar el rendimiento cuantitativo de las magnitudes que componen el hemograma. El control **COULTER Retic-X** por su parte, monitoriza a tres niveles de concentración el rendimiento de las magnitudes de los reticulocitos.

Respecto al control de calidad de los CPD analizados, la tecnología VCSn dispone de un control de calidad específico, el **Latron CP-X** que valora los tres principios de medida, impedancia, conductividad y los diferentes ángulos de dispersión. El material de control **Latron CP-X** consiste en unas partículas esféricas de látex que contienen resultados medios valorados para cada CPD y para cada lote de control. El seguimiento diario del **Latron CP-X** permite una monitorización de la tecnología VCSn asegurando los resultados obtenidos en los CPDs. Además, permite detectar de manera temprana

posibles desviaciones de la tecnología, recomendando los ajustes necesarios como una calibración de la célula de flujo.

En el transcurso de la tesis, diariamente se procesó el control **Latron CP-X** para asegurar la fiabilidad de los resultados obtenidos en los CPDs. Mensualmente se calcularon los indicadores de calidad para la imprecisión del **Latron CP-X**, obteniendo resultados dentro de las especificaciones del fabricante. Además, para asegurar la consistencia de los resultados obtenidos de los CPDs entre los diferentes analizadores disponibles en el laboratorio, se realizó un estudio con el material de control **Latron CP-X**. El estudio consistió en recoger los resultados del control **Latron CP-X** procesado diariamente en cada analizador durante 2 meses y comparar los valores medios obtenidos de los CPDs entre todos analizadores. Se determinó la diferencia porcentual (DP%) para valorar la consistencia de los resultados entre los diferentes analizadores. La DP% se calculó entre el valor medio de cada analizador y el valor medio del conjunto de analizadores. Los resultados mostraron una buena concordancia entre los analizadores y para todos los CPDs, con una DP% máxima de 2,72%. Destacar, que no se procesaron muestras de los diferentes estudios hasta que los controles de calidad diarios comentados anteriormente estaban procesados, revisados y validados.

A continuación, se detallan todos los materiales y métodos utilizados para cada trabajo y estudio. Todos ellos se llevaron a cabo en el **Servicio de Análisis Clínicos y Bioquímica del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, en Badalona**.

#### **4.1. TRABAJO 1. ESTUDIO DE LOS CELL POPULATION DATA DE SERIE ROJA EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LAS MICROCITOSIS**

El primer trabajo incluyó un total de 593 pacientes con microcitosis y 45 sujetos normales (GC= grupo control). De los pacientes con microcitosis, se seleccionaron retrospectivamente 488 pacientes que constituyeron la cohorte descriptiva, 250 con diagnóstico de AF y 238 de β-talasemia (BT), para poder definir el modelo descriptivo de cribado entre AF y BT. Posteriormente y de manera prospectiva se analizaron 104 pacientes, 53 con AF y 51 con BT, que formaron la cohorte de validación. El estudio se llevó a cabo entre abril y noviembre de 2022. Se incluyeron pacientes adultos (mayores 18 años) que no habían recibido en los tres meses previos a la entrada del estudio ningún tratamiento suplementario con hierro (oral o intravenoso), transfusión sanguínea, ni habían tenido un episodio hemorrágico agudo. Además, se excluyeron los casos con diagnóstico combinado de AF y BT, así como casos con presencia de variante de hemoglobina u otras hemoglobinopatías talasémicas diferentes a BT. Los sujetos pertenecientes al GC se seleccionaron en base a los siguientes criterios: procedencia de atención primaria con motivo de la solicitud “estudio básico de salud”, presentar unos resultados analíticos sin alteraciones y dentro del intervalo de referencia tanto del hemograma como en el metabolismo del hierro, no tener antecedentes de ferropenia y no presentar antecedentes de diagnóstico de enfermedad oncológica, hematológica ni inmunológica que pudieran alterar la celularidad.

Las muestras para la determinación del hemograma y CPDs se recogieron en tubos de anticoagulante EDTA-K3 del sistema Vacutainer (Becton-Dickinson, Rutherford, Nueva Jersey, EEUU) y se analizaron dentro de las 4 horas posteriores a su extracción. Las magnitudes del hemograma y CPDs se obtuvieron mediante el analizador hematológico automatizado Unicel DxH-900 (Beckman Coulter, Brea, CA, EEUU).

Los pacientes diagnosticados de AF presentaron una hemoglobina (Hb) inferior a 12 g/dL en varones o inferior 11 g/dL en mujeres, junto un déficit de hierro. El déficit de hierro se

definió como una ferritina sérica inferior a 15 µg/L y/o una saturación de transferrina inferior al 20%. La ferritina sérica y el índice de saturación de transferrina se determinaron en el AU-5800 (Beckman Coulter, Brea, CA, EEUU).

Para el diagnóstico de los pacientes con BT, se utilizó el análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento de hemoglobina (HPLC) (Variant II; Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU). Un valor de hemoglobina A2 (HbA2) superior al 3,5% se consideró diagnóstico de β-talasemia.

**Tabla 1. Magnitudes clásicas del hemograma y CPDs de serie roja.**

Magnitudes del hemograma	Magnitudes CPD
<i>Eritrocitos (RBC)</i>	<i>Media del Volumen de Reticulocitos (MN-V-RET)</i>
<i>Hemoglobina (Hb)</i>	<i>Desviación Estándar del Volumen de Reticulocitos (SD-V-RET)</i>
<i>Hematocrito (Hto)</i>	<i>Media de la Conductividad de Reticulocitos (MN-C-RET)</i>
<i>Volumen Corpuscular Medio (VCM)</i>	<i>Desviación Estándar de la Conductividad de Reticulocitos (SD-C-RET)</i>
<i>Hemoglobina Corpuscular Media (HCM)</i>	<i>Media del Volumen de No-Reticulocitos (MN-V-NonRET)</i>
<i>Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM)</i>	<i>Desviación Estándar del Volumen de No-Reticulocitos (SD-V-NonRET)</i>
<i>Amplitud de Distribución Eritrocitaria (ADE)</i>	<i>Media del Conductividad de No-Reticulocitos (MN-C-NonRET)</i>
<i>Desviación estandard de la ADE (ADE-SD)</i>	<i>Desviación Estándar de la Conductividad de No-Reticulocitos (SD-C-NonRET)</i>
<i>Recuento de reticulocitos (RET)</i>	

Se analizaron los resultados de las magnitudes de serie roja que componen el hemograma, así como los **CPDs** de la población de **RET** y **NonRET** (Tabla 1). Se analizaron los valores de la **MN** y la **SD** de todos los CPD de **V**, **C** y **Sn**. Sin embargo, los resultados referentes a la dispersión láser **Sn** no se muestran por no presentar diferencias

estadísticas entre los grupos analizados. Sí se muestran en cambio, los resultados referentes al **V** y la **C**.

Inicialmente, se analizaron las diferencias de los resultados de los CPDs de serie roja entre un grupo inicial de pacientes con microcitosis ( $225=147$  AF y  $78$  BT) y el GC. En la cohorte descriptiva compuesta por 488 pacientes, se estudiaron las diferencias de resultados entre ambos grupos y se analizó el rendimiento diagnóstico tanto de las magnitudes clásicas de serie roja del hemograma, como sus CPDs. Se combinaron los valores de las diferentes magnitudes con el objetivo de diseñar el mejor índice o fórmula para discriminar entre AF y BT, teniendo en cuenta los resultados obtenidos y las características celulares de las dos entidades. Para el diseño de la fórmula y potenciar el rendimiento diagnóstico, se tuvieron en cuenta las siguientes premisas:

- Seleccionar magnitudes con diferencias estadísticamente significativas entre BT y AF.
- Incluir en el numerador de la fórmula aquellas magnitudes que presentaban un mayor valor en las BT comparado con las AF.
- Incluir en el denominador aquellas magnitudes que, de manera significativa, presentan un menor valor en las BT que en las AF.

Una vez obtenido el modelo descriptivo para el cribado entre AF y BT, la fórmula obtenida en la cohorte descriptiva se evaluó en un segundo grupo de pacientes, considerado el grupo de validación. Este grupo de validación incluyó prospectivamente a 53 pacientes con AF y 51 con BT.

Además, para evaluar la robustez de los resultados obtenidos en nuestra fórmula, se compararon y evaluaron en la población de estudio los siguientes índices y/o fórmulas descritas en la literatura científica: **Mentzer** (MCV/RBC) (49), **England y Fraser** (MCV-RBC- $5 \times$ Hb-3,4) (50), **Shine y Lal**. (MCV $2 \times$ MCH/100) (51), **Ricerca** (ADE/RBC) (52), **Ehsani** (MCV- $10 \times$ RBC) (53), **Srivastava** (MCH/RBC) (54), **Green y King** (MCV $2 \times$ RDW/Hb $\times$ 100) (55) y **Sirdah** (MCV-RBC- $3 \times$ Hb) (56).

Se realizó una prueba t (*t-student*) de muestra independiente para estudiar las diferencias significativas entre los dos grupos de pacientes. Se realizó un análisis de curvas ROC para demostrar el rendimiento diagnóstico de los CPDs de manera individual, así como de las

diferentes fórmulas evaluadas. Para cada CPD y fórmula, se determinó el área bajo la curva (AUC) con un intervalo de confianza del 95% (IC95%), la sensibilidad, especificidad y el índice de Youden [ $Y = (\text{sensibilidad} + \text{especificidad}) - 100$ ]. Se consideró la magnitud con mayor precisión diagnóstica aquella que presentaba una AUC más alta. Se consideró una precisión diagnóstica significativa las magnitudes y fórmulas que presentaron un AUC superior a 0,80. Se consideraron estadísticamente significativos valores de  $p < 0,05$ . Los resultados fueron analizados con el programa estadístico SPSS versión 20.0.

## **4.2. TRABAJO 2. EVALUACIÓN DE LOS *CELL POPULATION DATA* DE LA POBLACIÓN DE NEUTRÓFILOS EN EL DIAGNÓSTICO DE LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS.**

Como se ha mencionado anteriormente, el trabajo II analiza los CPDs de la población de neutrófilos en pacientes con SMD y está constituido por 3 estudios diferentes. En cada uno de los estudios los pacientes incluidos y que forman la población estudiada son distintos, reclutándose durante diferentes períodos. A continuación, se especifican con detalle todos los materiales y métodos utilizados en cada uno de los estudios.

### **4.2.1. Estudio 2.1. Valoración de los *Cell Population Data* en pacientes con Síndrome Mielodisplásico.**

El primer estudio del segundo trabajo incluyó un total de 104 pacientes divididos en 60 sujetos normales (grupo control= GC) y 54 pacientes con diagnóstico de SMD (grupo de estudio= SMD). Los pacientes con SMD correspondieron a: 18 pacientes con Citopenia Refractaria con Displasia Multilínea (CRDM), 11 con SMD con del5q-, 11 con Anemias Refractarias con Exceso de Blastos (AREB) y 14 pacientes con Anemias Refractarias con Sideroblastos en Anillos (ARSA). El diagnóstico final del SMD se obtuvo mediante el estudio de médula ósea o biopsia y se realizó en base a la clasificación de la OMS de 2016 (32). Los sujetos pertenecientes al GC se seleccionaron en base a los siguientes

criterios: procedencia de atención primaria con motivo de la solicitud "estudio básico de salud", presentar unos resultados analíticos sin alteraciones y dentro del rango de referencia y no presentar antecedentes de diagnóstico de enfermedad oncológica, hematológica ni inmunológica que pudieran alterar la celularidad. El estudio se llevó a cabo entre agosto del 2016 y mayo del 2017.

Las extracciones de las muestras de sangre fueron recogidas en tubos con anticoagulante EDTAK3 del sistema Vacutainer (Becton-Dickinson, Rutherford, Nueva Jersey, EEUU) y se analizaron dentro de las 4 horas posteriores a su extracción. Se realizó la determinación del hemograma por el analizador hematológico DxH-800 (Beckman Coulter, Brea, CA, EEUU). Junto con el hemograma se obtuvieron los CPDs de la población de neutrófilos mediante la tecnología VCSn. Se estudiaron los valores de la MN y la SD de los CPDs de Volumen (**MN-V-NE** y **SD-V-NE**), Conductividad (**MN-C-NE** y **SD-C-NE**) y Dispersión Láser (Sn) en diferentes ángulos:

- Dispersión ángulo medio SM ( $9^0$ - $43^0$ ): **MN-SM-NE** y **SD-SM-NE**
- Dispersión ángulo bajo SL ( $9^0$ - $19^0$ ): **MN-SL-NE** y **SD-SL-NE**
- Dispersión ángulo alto SU ( $20^0$ - $43^0$ ): **MN-SU-NE** y **SD-SU-NE**
- Dispersión ángulo axial SA ( $5^0$ ): **MN-SA-NE** y **SD-SA-NE**
- Dispersión ángulo lateral AL2 ( $0^0$ ): **MN-AL2-NE** y **SD-AL2-NE**

Se realizó la prueba *t-student* para la comparación de la concentración de neutrófilos y la U-Mann Whitney para valorar las diferencias de las medias de los CPDs en los 2 grupos estudiados, considerándose significativa una  $p <0,05$ . Se calculó el rendimiento diagnóstico de los CPDs mediante el análisis de las áreas bajo la curva (AUC) de las curvas ROC, con un intervalo de confianza del 95% (IC95), considerándose significativo aquellos valores de  $AUC \geq 0,800$ . Los resultados se analizaron con el programa estadístico SPSS v20,0.

#### **4.2.2. Estudio 2.2. Distinción entre Síndromes Mielodisplásicos y citopenias no clonales mediante el estudio de Cell Population Data.**

Para este segundo estudio se incluyeron un total de 102 pacientes que presentaban alguna citopenia en sangre periférica. Los pacientes fueron clasificados en 3 grupos distintos correspondientes a: 23 pacientes con diagnóstico de SMD, 48 pacientes con hepatopatía (HPT) y 31 pacientes con enfermedad renal crónica (ERC). El estudio se llevó a cabo entre marzo y mayo del 2018.

Todos los pacientes cumplieron el criterio de inclusión de presentar un recuento de leucocitos  $< 4,0 \times 10^9/L$  y como mínimo una de las siguientes citopenias: concentración de hemoglobina  $< 10 \text{ g/dL}$ , recuento de neutrófilos  $< 1,8 \times 10^9/L$  y/o recuento de plaquetas  $< 100 \times 10^9/L$ .

Las extracciones de las muestras de sangre fueron recogidas en tubos con anticoagulante EDTAK3 del sistema Vacutainer (Becton-Dickinson, Rutherford, Nueva Jersey, EEUU) y se analizaron dentro de las 4 horas posteriores a su extracción. Los resultados del hemograma se obtuvieron mediante el analizador hematológico DxH-800 (Beckman Coulter, Brea, CA, EEUU). Junto con el hemograma se obtuvieron los CPDs de la población de neutrófilos mediante la tecnología VCSn. Se estudiaron los valores de la media posicional (MN) y la desviación estándar (SD) de los CPD de Volumen (**MN-V-NE** y **SD-V-NE**), Conductividad (**MN-C-NE** y **SD-C-NE**) y Dispersión Láser (Sn) en diferentes ángulos:

- Dispersión ángulo medio SM ( $9^0$ - $43^0$ ): **MN-SM-NE** y **SD-SM-NE**
- Dispersión ángulo bajo SL ( $9^0$ - $19^0$ ): **MN-SL-NE** y **SD-SL-NE**
- Dispersión ángulo alto ( $20^0$ - $43^0$ ): **MN-SU-NE** y **SD-SU-NE**
- Dispersión ángulo axial SA ( $5^0$ ): **MN-SA-NE** y **SD-SA-NE**
- Dispersión ángulo lateral AL2 ( $0^0$ ): **MN-AL2-NE** y **SD-AL2-NE**

Además de la evaluación individual de cada CPD de la población de neutrófilos, también se estudiaron los rendimientos que ofrecían distintas fórmulas creadas a partir de diferentes combinaciones entre las magnitudes clásicas del hemograma y los CPDs de neutrófilos. Dichas combinaciones se desarrollaron teniendo en cuenta los resultados diferenciales entre los grupos analizados y aquellas magnitudes con mejor AUC. A continuación, se enumeran las combinaciones evaluadas: **Suma de ángulos MN** (MN-SM-NE + MN-SU-NE + MN-SL-NE), **Suma de desviaciones ángulos** (SD-SM-NE + SD-SU-NE + SD-SL-NE), **Cociente entre MN y SD de ángulos** ((MN-SM-NE + MN-SU-NE + MN-SL-NE) / (SD-SM-NE + SD-SU-NE + SD-SL-NE)) y **Suma de ángulos por el % de neutrófilos** ((SU-NEU + SL-NEU) x NEU%). Las fórmulas se idearon a partir de aquellas magnitudes que presentaron un mayor rendimiento individual y que podrían potenciar la precisión diagnóstica diagnóstica de los CPDs individuales.

Se realizó la prueba ANOVA para valorar las diferencias de medias en las magnitudes estudiadas, considerándose significativa una  $p < 0,05$ . La capacidad diagnóstica para identificar correctamente los SMD del resto de citopenias (HP + ERC) se calculó a partir del rendimiento de los CPDs y sus combinaciones mediante el análisis de AUC de las curvas ROC, con un intervalo de confianza del 95% (IC95), considerándose significativo aquellos rendimientos con una  $AUC \geq 0,800$ . Los resultados se analizaron con el programa estadístico SPSS v20,0.

#### **4.2.3. Estudio 2.3. Detección de disgranulopoyesis: utilidad de los *Cell Population Data* de la población de neutrófilos.**

En el tercer estudio que forma parte del trabajo II, se estudiaron retrospectivamente un total de 83 muestras procedentes de 42 pacientes con diagnóstico de SMD y 41 sujetos sanos (GC). El estudio se realizó entre noviembre de 2021 y abril de 2022. Las extracciones de las muestras de sangre fueron recogidas en tubos con anticoagulante EDTAK3 del sistema Vacutainer (Becton-Dickinson, Rutherford, Nueva Jersey, EEUU) y se analizaron dentro de las 4 horas posteriores a su extracción. Los sujetos pertenecientes al GC se

seleccionaron en base a los siguientes criterios: procedencia de atención primaria con motivo de la solicitud “estudio básico de salud”, presentar unos resultados analíticos sin alteraciones y dentro del rango de referencia y no presentar antecedentes de diagnóstico de enfermedad oncológica, hematológica ni inmunológica que pudieran alterar la celularidad.

Los CPDs de la población de neutrófilos se obtuvieron a partir del análisis del hemograma procesado en el analizador hematológico automatizado Unicel DxH-900 (Beckman Coulter, Brea, CA, EEUU) mediante la tecnología VCSn. Se estudiaron los valores de la media posicional (MN) y la desviación estándar (SD) de los CPD de Volumen (**MN-V-NE** y **SD-V-NE**), Conductividad (**MN-C-NE** y **SD-C-NE**) y dispersión láser (Sn) en diferentes ángulos:

- Dispersión ángulo medio SM ( $9^0$ - $43^0$ ): **MN-SM-NE** y **SD-SM-NE**
- Dispersión ángulo bajo SL ( $9^0$ - $19^0$ ): **MN-SL-NE** y **SD-SL-NE**
- Dispersión ángulo alto ( $20^0$ - $43^0$ ): **MN-SU-NE** y **SD-SU-NE**
- Dispersión ángulo axial SA ( $5^0$ ): **MN-SA-NE** y **SD-SA-NE**
- Dispersión ángulo lateral AL2 ( $0^0$ ): **MN-AL2-NE** y **SD-AL2-NE**

Tras el análisis del hemograma, de cada muestra EDTAK3 se realizó una extensión de sangre periférica y posterior tinción con May-Grünwald Giemsa en el extensor-teñidor automatizado DxH-SMS (Beckman Coulter, Brea, CA, EEUU).

La revisión del frotis de sangre periférica fue realizada por 2 observadores con amplia experiencia en citología hematológica. Ambos observadores evaluaron el porcentaje de neutrófilos hipogranulados (%HGRAN) y el porcentaje de hiposegmentados (%HSEG) mediante microscopía digital proporcionada por el analizador Cellavision DM9600 (CellaVision AB, Lund, Suecia). La media entre los 2 observadores se utilizó para realizar el análisis estadístico. Aquellas muestras con diferencias superiores al 10% entre los 2 observadores fueron evaluadas por un tercer revisor, obteniendo una media de 3 observadores.

Se analizó el rendimiento diagnóstico de los diferentes CPDs de la población de neutrófilos para identificar aquellas muestras con presencia de disgranulopoyesis significativa, utilizando un punto de corte  $> 10\%$  de HGRAN y  $> 10\%$  de HSEG. Las variables cuantitativas se expresaron como mediana (M) y rango intercuartil (IQ). Para valorar las diferencias entre los 2 grupos estudiados se utilizó el test U Mann-Whitney. La asociación entre variables se analizó por correlación de Spearman. El rendimiento diagnóstico de los diferentes CPDs de los neutrófilos para predecir la presencia de  $> 10\%$  HGRAN y  $> 10\%$  HSEG se calculó mediante el análisis de curvas ROC del área bajo la curva (AUC), considerando significativa una AUC  $> 0,800$ . Un valor  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo. El análisis estadístico se realizó con los programas SPSS software (v25.0) y MedCalc (v.19.5.3).

#### **4.3. TRABAJO 3. EVALUACIÓN DE LOS *CELL POPULATION DATA* DE LA POBLACIÓN DE MONOCITOS EN EL DIAGNÓSTICO PRECOZ DE SEPSIS.**

Al igual que en el segundo trabajo, el trabajo 3 está compuesto por tres estudios diferentes que analizan el papel de los CPDs de monocitos, específicamente el MDW, en el diagnóstico de infecciones con una gran relevancia clínica como son la sepsis y la COVID19.

##### **4.3.1. Estudio 3.1. Evaluación del MDW en el diagnóstico precoz de sepsis en pacientes que acuden a urgencias.**

El primer estudio realizado sobre el MDW pretende dar respuesta al primer objetivo planteado: confirmar la validez clínica y el rendimiento del MDW como biomarcador precoz de sepsis en pacientes que acuden a urgencias, verificar el punto de corte para

los tubos con anticoagulante K3EDTA y comparar los resultados con otros biomarcadores de infección como PCR y PCT.

El estudio se llevó a cabo entre agosto del 2018 y junio del 2019. Se incluyeron de forma prospectiva un total de 751 pacientes adultos (> 18 años), siendo 71 excluidos por no cumplir algunos de los criterios de inclusión (edad superior a 18 años, datos clínicos/analíticos completos, pacientes sin con ingreso previo durante el estudio y pacientes sin diagnóstico de enfermedad hematológica o inmunológica), quedando finalmente 680 pacientes en el análisis final. Considerando los criterios para SEPSIS-2 (9), 144 pacientes fueron catalogados como sepsis, representando una prevalencia del 21,2%. Sin embargo, según los criterios de SEPSIS-3 (8), se diagnosticaron 101 pacientes sépticos, con una prevalencia del 14,9%. Es importante destacar que 248 de los pacientes incluidos (36,5%), se analizaron como un subgrupo de baja probabilidad de sepsis. Este subgrupo estaba constituido por pacientes que no presentaron, a su llegada al servicio de urgencias, síntomas para la sospecha de un proceso infeccioso, no solicitándose así pruebas analíticas relacionadas con infección o sepsis, tales como la PCR o la PCT.

A todos los pacientes a su llegada a urgencias se les solicitó una analítica que incluía la determinación del MDW junto al hemograma y la extracción de un tubo de suero adicional para la determinación de PCR y PCT en suero. Las extracciones de las muestras de sangre fueron recogidas en tubos con anticoagulante EDTAK3 del sistema Vacutainer (Becton-Dickinson, Rutherford, Nueva Jersey, EEUU). Las mediciones del MDW y hemograma se procesaron en el analizador Unicel DxH-900 (Beckman Coulter, Brea, CA, EEUU) con la versión del software 1.0.0.329, dentro de las 2 horas posteriores a su extracción. Diariamente se procesaron los controles de calidad COULTER 6C Plus Cell Control y COULTER LATRON CP-X. Las concentraciones de PCT y PCR se midieron en los analizadores Liaison XL (DiaSorin, Saluggia, Italia) y AU5800 (Beckman Coulter, Brea, CA, EEUU), respectivamente.

#### **4.3.2. Estudio 3.2. Utilidad del MDW en el diagnóstico y pronóstico de pacientes con sepsis que ingresan en UCI.**

Estudio prospectivo de cohortes de pacientes ingresados consecutivamente en la UCI del HGT durante el periodo de febrero de 2019 hasta enero de 2020. Se excluyeron aquellos pacientes con ingreso en UCI inferior a 24 horas, edad menor a 18 años, datos clínicos/analíticos incompletos o paciente con ingreso previo durante el estudio.

Al ingreso en UCI los pacientes fueron diagnosticados de acuerdo con el Tercer Consenso Internacional para la definición de Sepsis y Shock Séptico (SEPSIS-3) (8) en 3 grupos: no infectados, sépticos y shocks sépticos. Al ingreso los pacientes reclutados se dividieron en 2 grupos:

- Pacientes con sepsis: se les realizó un seguimiento analítico y clínico durante los primeros 9 días de ingreso o hasta el alta de UCI.
- Pacientes sin sepsis: seguimiento analítico y clínico durante los 12 primeros días del ingreso o hasta el alta en UCI.

Se recogieron las variables de edad, sexo, diagnóstico temprano de sepsis (< 24 horas), mortalidad e índices de gravedad (APACHE II: acute physiology and chronic health evaluation II y SOFA: sequential organ failure assessment) en UCI.

Se realizó diariamente la determinación del hemograma junto al MDW en sangre total (EDTAK3), entre las 2 primeras horas de la extracción de la muestra. Los resultados se obtuvieron de los analizadores hematológicos Unicel DxH-900 (Beckman Coulter). Diariamente se procesaron los controles de calidad COULTER 6C Plus Cell Control y COULTER LATRON CP-X para el MDW. La determinación de PCR y PCT se realizó en suero cada 3 días, previa centrifugación de la muestra a 1500g durante 10 minutos, entre las primeras 4 horas de la extracción venosa. La concentración de PCR se determinó por inmunoturidimetría (AU5800; Beckman Coulter) y la concentración de PCT mediante inmunoensayo (Liaison XL; Diasorin).

Se comprobó la distribución normal de las variables cuantitativas mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las asociaciones entre el diagnóstico basado en los criterios de SEPSIS-3 (clasificados en tres grupos) y un biomarcador se evaluaron mediante la prueba de Kruskall-Wallis. En el estudio de la correlación entre las puntuaciones MDW y SOFA/APACHE se utilizó la correlación de Spearman. El rendimiento diagnóstico de los diferentes biomarcadores se evaluó calculando el área bajo la curva (AUC), la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo (VPP), el valor predictivo negativo (VPN) y los cocientes de probabilidad positivo (LR+) y negativo (LR-), junto con sus intervalos de confianza (IC) del 95%. Las diferencias en AUC se utilizaron para demostrar el valor añadido de MDW en comparación con diferentes biomarcadores individuales y combinados, calculados utilizando un modelo logístico de una variable predictiva con un biomarcador y un modelo logístico de dos variables predictivas con varios biomarcadores, como predictor, y utilizando el estado de sepsis como respuesta.

Para evaluar la asociación entre el valor de MDW y la mortalidad global, se realizó un análisis longitudinal de los datos en el que la variable dependiente fue la mortalidad y las variables independientes fundamentales fueron el valor MDW y el momento en que se realizó su medición (días 0, 3, 6, 9 tras el ingreso en la UCI). Por lo tanto, en este análisis, cada paciente podía aportar 4 registros diferentes, uno por cada medición de MDW. Dado que los datos estaban correlacionados, se utilizó un modelo GEE (*Generalized Estimating Equation*) para ajustarlos. Para minimizar el efecto de las posibles diferencias entre los dos grupos a comparar (exitus vs no exitus), se añadieron como covariables en el modelo la edad, el sexo y el SOFA. Para todos los análisis y comparaciones, un valor de  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo. Para todos los análisis estadísticos se utilizaron los programas SPSS versión 25 y Medcalc versión 19.5.3.

#### **4.3.3. Estudio 3.3. Eficacia del MDW como biomarcador de cribado en la identificación de pacientes con COVID19 que acuden a urgencias.**

Estudio clínico retrospectivo que incluyó pacientes adultos que acudieron al servicio de urgencias del HGT por síntomas sugestivos de enfermedad COVID-19. Los pacientes se seleccionaron a lo largo del periodo del estudio, entre el 14 de marzo y el 11 de mayo de 2020, para garantizar un número suficiente de casos negativos y una distribución representativa de los casos presentados a lo largo del tiempo. Inicialmente se incluyeron un total de 555 pacientes, excluyéndose 22 pacientes por falta de datos analíticos, quedando finalmente 523 pacientes en el estudio.

Los pacientes COVID19 positivos se identificaron mediante la detección del virus SAR-CoV-2 por RT-PCR en muestras nasofaríngeas. Se recogieron 175 pacientes COVID19 negativos y 348 pacientes COVID19 positivos. Los pacientes COVID19 positivos se clasificaron en 3 categorías de gravedad (Figura 17); leve, severa y crítica en base a los criterios utilizados en el centro y en consonancia con las directrices de las guías NIH (*National Institutes of Health*) para la gravedad de la COVID19.

Todas las variables demográficas y clínicas recogidas en el estudio se obtuvieron a través de la historia clínica del paciente previo consentimiento.

<p><b>Leve</b>  <i>(Se deben cumplir todos los siguientes criterios)</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PaFi &gt; 250</li> <li>• FR &lt; 30rpm</li> <li>• Dímero-D &lt; 1500ng/mL</li> <li>• IL-6 &lt; 40pg/mL</li> <li>• Infiltrados pulmonares periféricos unilobulares o bilaterales leves</li> </ul>
<p><b>Grave</b>  <i>(PaFi 150-250 y cualquier de los siguientes criterios)</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RF &gt; 30rpm</li> <li>• Dímero-D &gt; 1500ng/mL</li> <li>• IL-6 &gt; 40pg/mL</li> <li>• Infiltrados pulmonares multilobulares.</li> </ul>
<p><b>Crítica</b>  <i>(Se aplica a cualquiera de los siguientes criterios)</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PaFi &lt; 150</li> <li>• Necesidad de aminas vasopresoras</li> <li>• Necesidad de ventilación mecánica no invasiva o presión positiva bi-nivel en vías respiratorias.</li> <li>• Necesidad de cánula nasal de alto flujo, intubación orotraqueal o ventilación invasiva</li> <li>• Puntuación SOFA <math>\geq 2</math></li> </ul>

**PaFi** [PO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>]: relación entre la presión parcial de oxígeno arterial y la fracción de oxígeno inspirado. **FR**: frecuencia respiratoria. **SOFA**: sequential organ failure assessment.

**Figura 17: Categorías de gravedad para COVID19 y sus criterios de aplicación.**

A todos los pacientes se le realizó a su llegada a urgencias la determinación de un hemograma junto el MDW en sangre total (EDTAK3), entre las 2 primeras horas de la extracción de la muestra. Los resultados se obtuvieron de los analizadores hematológicos DxH-900 (Beckman Coulter, Brea, CA, EEUU). Diariamente se procesaron los controles de calidad COULTER 6C Plus Cell Control y COULTER LATRON CP-X para el MDW. Junto con el hemograma y MDW, se realizó también la determinación de los siguientes biomarcadores: proteína C reactiva (PCR) por inmunoturidimetría (AU5800; Beckman Coulter), procalcitonina (PCT) por inmunoensayo (Liaison XL; Diasorin), interleucina 6 (IL-6) por inmunoensayo (Dxl 800, Beckman Coulter) y Dímero-D mediante inmuniturbidimetría por partículas de látex (Acl-TOP, Instrumentation Laboratory).

Se comprobó la distribución normal de las variables cuantitativas mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. La capacidad diagnóstica se evaluó en términos de área bajo la curva ROC (AUC), sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor

predictivo negativo (VPN), cocientes de probabilidad positivos (LR+) y negativos (LR-), junto con sus intervalos de confianza (IC) del 95%. Los odds ratios (cocientes de probabilidades postprueba) para el diagnóstico de COVID-19 entre combinaciones de biomarcadores con valores MDW anormales y normales se calcularon en base a la prevalencia de COVID-19 para la población de estudio. La curva de Kaplan-Meier es una representación gráfica de la función de supervivencia. Es una estimación no paramétrica de la función de supervivencia y no hace ninguna suposición sobre la distribución subyacente de los datos. Aquí utilizamos Kaplan-Meier para mostrar la duración de la estancia en subgrupos de pacientes en relación con el punto de corte del MDW.

## 5. RESULTADOS

## 5.1. TRABAJO 1. ESTUDIO DE LOS *CELL POPULATION DATA* DE SERIE ROJA EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LAS MICROCITOSIS

Los datos obtenidos en el análisis de los CPDs de serie roja entre el GC y pacientes con microcitosis se muestran en la Tabla 2. Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el GC y pacientes con microcitosis en casi todos los CPDs analizados. De la cohorte descriptiva correspondiente a 488 pacientes con microcitosis, la Tabla 3 muestra los resultados obtenidos entre los pacientes con AF y BT para las magnitudes del hemograma y los CPDs. La concentración media de Hb fue de  $10,61 \pm 1,44$  g/dL y  $11,84 \pm 1,25$  g/dL en los grupos AF y BT, respectivamente. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en casi todas las magnitudes analizadas. Los pacientes diagnosticados de BT presentaron, de manera significativa, un mayor recuento de eritrocitos ( $5,76 \times 10^6/\mu\text{L}$  vs  $4,45 \times 10^6/\mu\text{L}$ ;  $p<0,001$ ) y reticulocitos ( $95,99 \times 10^3/\mu\text{L}$  vs  $62,23 \times 10^3/\mu\text{L}$ ;  $p<0,001$ ), junto a un menor VCM ( $64,87$  fL vs  $75,08$  fL;  $p<0,001$ ) y una menor ADE-SD ( $37,73$  vs  $48,59$ ;  $p<0,001$ ) que los pacientes con AF.

Los CPDs de RET y Non-RET mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,001$ ) entre los grupos de AF y BT (Tabla 3). Los CPDs **MN-V-RET** y **SD-V-RET** en la población RET y **MN-V-NonRET** y **SD-V-NonRET** en la población de eritrocitos, fueron significativamente menores en pacientes diagnosticados con BT ( $p<0,001$ ). Sin embargo, respecto a la C, la MN y la SD en ambas poblaciones (**MN-C-RET**, **SD-C-RET**, **MN-C-NonRET** y **SD-C-NonRET**) fueron significativamente mayores en los pacientes con BT ( $p<0,001$ ). Las Figuras 18 y 19 muestran gráficamente la distribución de los valores de CPD para el V y la C de los diferentes grupos en la población RET y NonRET, respectivamente.

**Tabla 2. Valores de CPDs de serie roja entre el grupo control y pacientes con microcitosis.**

CPD	CG	AF	BT	P		
	N=45 (m ± de)	N=147 (m ± de)	N=78 (m ± de)	CG vs AF	GC vs BT	AF vs BT
<b>MN-V-RET</b>	54,4±2,3	54,4±5,0	46,1±2,8	0,994	<0,001	<0,001
<b>SD-V-RET</b>	14,0±0,9	14,7±1,5	14,1±1,1	<b>0,008</b>	0,896	<b>0,007</b>
<b>MN-C-RET</b>	73,4±1,8	72,5±3,2	82,6±6,6	0,463	<0,001	<0,001
<b>SD-C-RET</b>	17,3±1,1	18,7±2,3	25,2±4,2	<b>0,014</b>	<0,001	<0,001
<b>MN-V-NonRET</b>	43,4±2,3	38,9±3,8	34,4±2,1	<0,001	<0,001	<0,001
<b>SD-V-NonRET</b>	12,2±0,5	11,6±1,1	11,0±0,7	<0,001	<0,001	<0,001
<b>MN-C-NonRET</b>	74,8±0,8	73,1±2,7	83,4±6,3	0,052	<0,001	<0,001
<b>SD-C-NonRET</b>	17,8±0,6	19,1±1,7	25,7±3,8	<b>0,008</b>	<0,001	<0,001

**GC:** grupo control. **AF:** anemia ferropénica. **BT:** β-talasemia. **m:** media. **de:** desviación estándar. **MN-V-RET:** Media del Volumen de Reticulocitos. **SD-V-RET:** Desviación estándar del Volumen de Reticulocitos. **MN-C-RET:** Media de la Conductividad de Reticulocitos. **SD-C-RET:** Desviación estándar de la Conductividad de Reticulocitos. **MN-V-NonRET:** Media del Volumen de No-Reticulocitos. **SD-V-NonRET:** Desviación estándar del Volumen de No-Reticulocitos. **MN-C-NonRET:** Media del Conductividad de No-Reticulocitos. **SD-C-NonRET:** Desviación estándar de la Conductividad de No-Reticulocitos.

**Tabla 3. Valores de las magnitudes del hemograma y CPDs de serie roja en AF y BT.**

Magnitud	AF	BT	P
	N=250 (m ± de)	(N=238) (m ± de)	
<b>RBC (x10<sup>6</sup>/μL)</b>	4,45±0,56	5,76±0,62	<0,001
<b>Hb (g/dL)</b>	10,61±1,44	11,84±1,25	<0,001
<b>Hto (%)</b>	33,38±4,17	37,29±3,87	<0,001
<b>VCM (fL)</b>	75,08±7,61	64,87±4,25	<0,001
<b>HCM (pg)</b>	23,87±2,88	20,61±1,47	<0,001
<b>CHCM (g/dL)</b>	31,73±0,96	31,76±0,66	0,726
<b>ADE (%)</b>	18,49±2,18	16,70±1,42	<0,001
<b>ADE-SD</b>	48,59±6,80	37,73±3,62	<0,001
<b>Reticulocitos (x10<sup>3</sup>/μL)</b>	62,23±21,46	95,99±27,68	<0,001
<b>Reticulocitos (%)</b>	1,41±0,52	1,67±0,52	<0,001
<b>MN-V-RET</b>	53,45±5,14	46,18±3,27	<0,001
<b>SD-V-RET</b>	14,44±1,49	13,78±1,35	<0,001
<b>MN-C-RET</b>	73,87±4,01	82,62±6,05	<0,001
<b>SD-C-RET</b>	17,29±3,07	22,71±5,34	<0,001
<b>MN-V-NonRET</b>	37,96±3,80	33,72±2,31	<0,001
<b>SD-V-NonRET</b>	11,17±1,15	10,47±0,84	<0,001
<b>MN-C-NonRET</b>	74,00±3,91	83,65±6,34	<0,001
<b>SD-C-NonRET</b>	17,33±3,14	23,63±5,11	<0,001

AF: anemia ferropénica. BT: β-talasemia. **m**: media. **de**: desviación estándar. **RBC**: eritrocitos. **Hb**: hemoglobina. **Hto**: hematocrito. **VCM**: volumen corpuscular medio. **HCM**: hemoglobina corpuscular media. **MCHCM**: concentración de hemoglobina corpuscular media. **ADE**: amplitud de distribución eritrocitaria. **ADE-SD**: desviación estandar de ADE. **MN-V-RET**: Media del Volumen de Reticulocitos. **SD-V-RET**: Desviación Estandar del Volumen de Reticulocitos. **MN-C-RET**: Media de la Conductividad de Reticulocitos. **SD-C-RET**: Desviación Estandar del Volumen de Reticulocitos. **MN-V-NonRET**: Media del Volumen de No-Reticulocitos. **SD-V-NonRET**: Desviación Estandar del Volumen de No-Reticulocitos. **MN-C-NonRET**: Media del Conductividad de No-Reticulocitos. **SD-C-NonRET**: Desviación Estandar de la Conductividad de No-Reticulocitos.

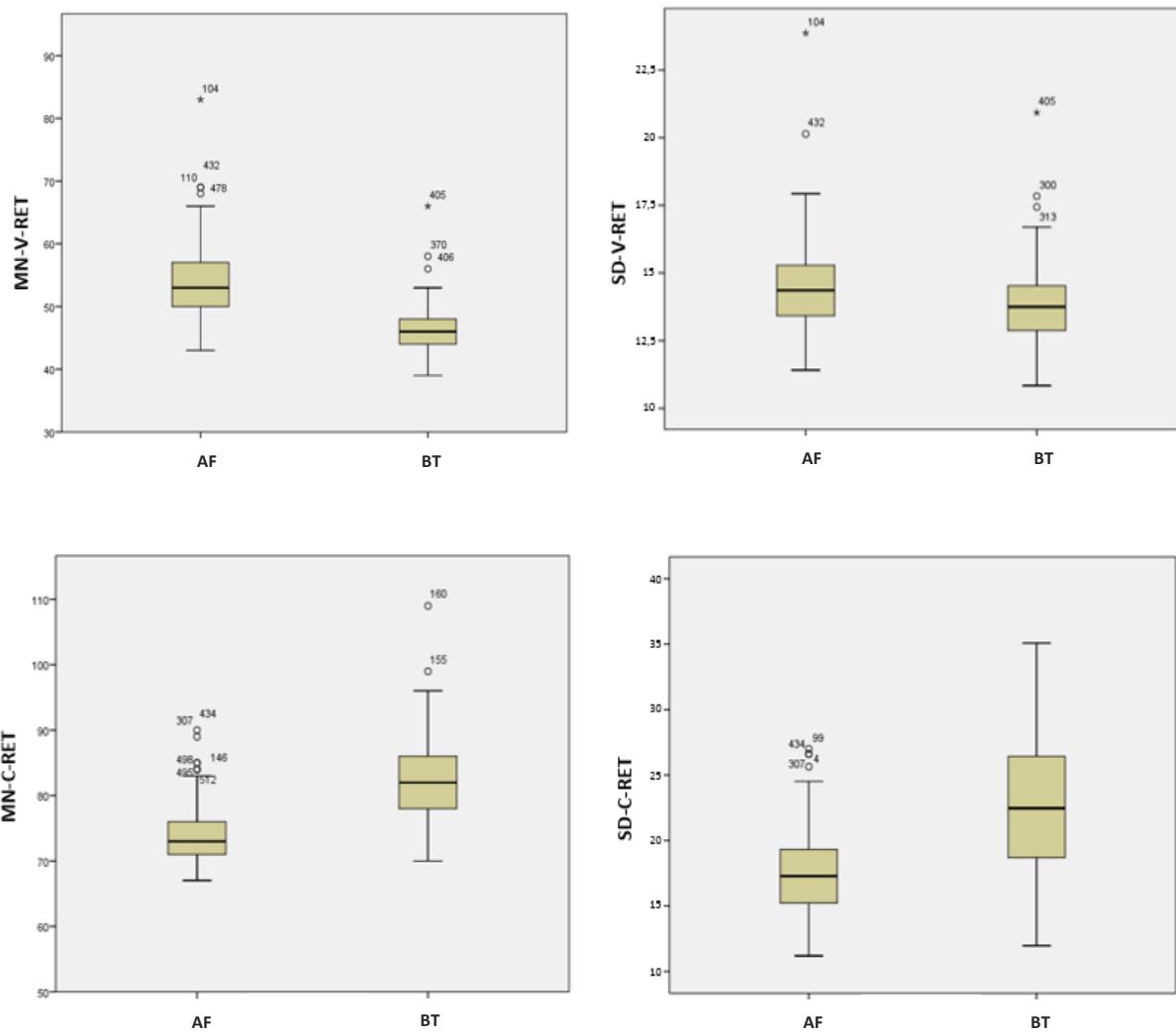


Figura 18. Diagramas de cajas correspondientes a la distribución de los valores de los CPDs de Volumen y Conductividad (MN y SD) para las poblaciones RET en los diferentes grupos estudiados.

Los resultados de AUC para cada CPD en la población RET y NonRET y sus correspondientes gráficas de las curvas ROC se muestran en la Tabla 4 y en la Figura 20, respectivamente. A excepción del CPD SD-V-RET, correspondiente a la desviación estándar del volumen de los reticulocitos, el resto de CPDs mostraron individualmente un buen rendimiento discriminatorio ( $AUC > 0,80$ ) entre BT y AF. La **MN-C-NonRET** (media de la conductividad en la población de eritrocitos) y la **MN-V-RET** (media del volumen de los reticulocitos) fueron las mejores magnitudes discriminatorias individuales para distinguir entre BT y AF mediante el análisis de curvas ROC, con una AUC cada una de 0,91.

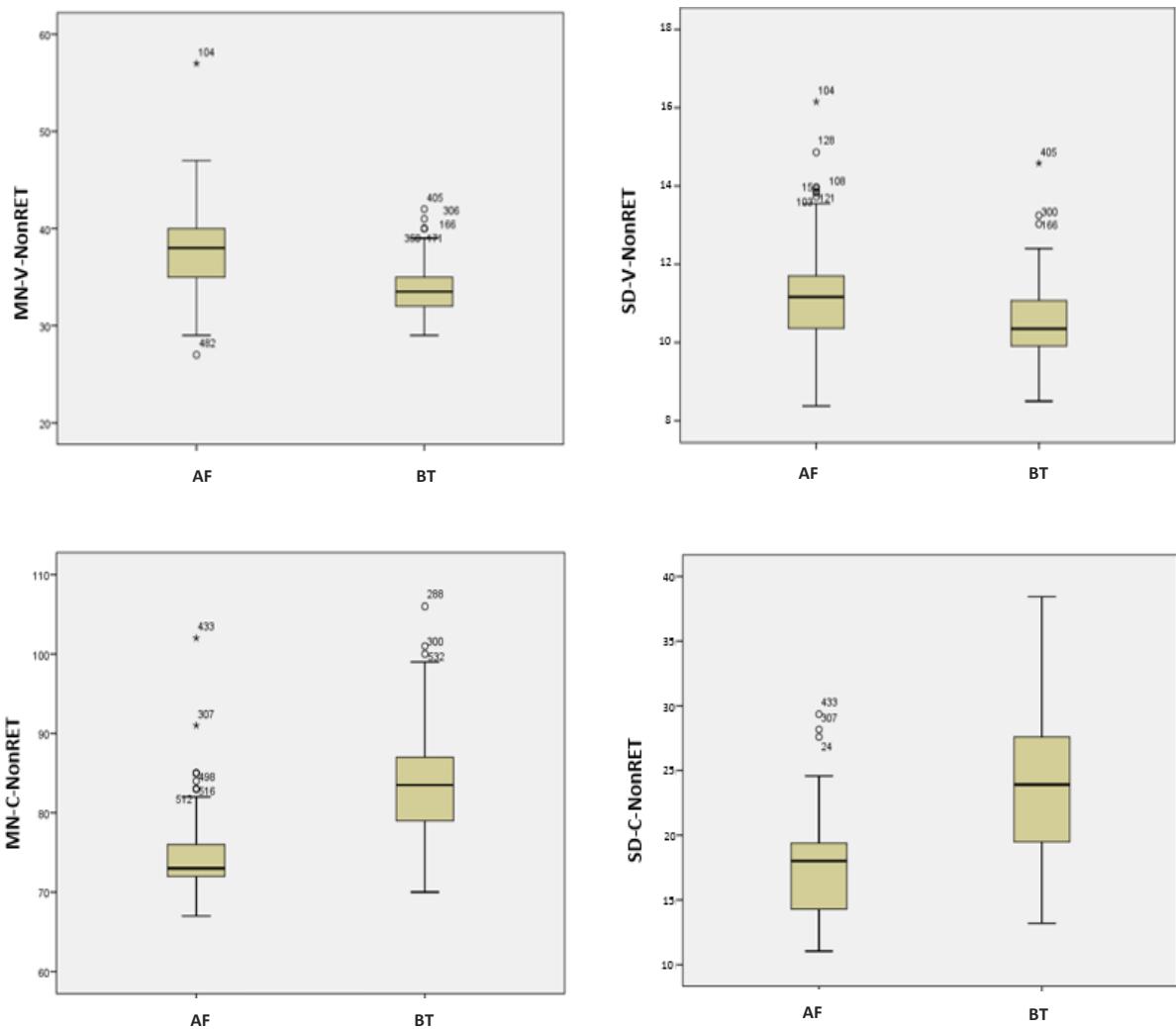


Figura 19. Diagrama de caja correspondientes a la distribución de los valores para los CPDs de Volumen y Conductividad (MN y SD) para las poblaciones NonRET en los diferentes grupos estudiados.

Teniendo en cuenta las diferencias en las magnitudes del hemograma entre los pacientes con AF y BT, y los resultados obtenidos para los diferentes CPDs, se diseñó la siguiente fórmula, descrita como CMI (**Fórmula CMI: CPD Microcitosis-Índice**), para potenciar el rendimiento diagnóstico entre AF y BT:

**Fórmula CMI= [RBC x (MNCRET + SDCRET) x 1000] / (MNVNonRET x ADE-SD x VCM)**

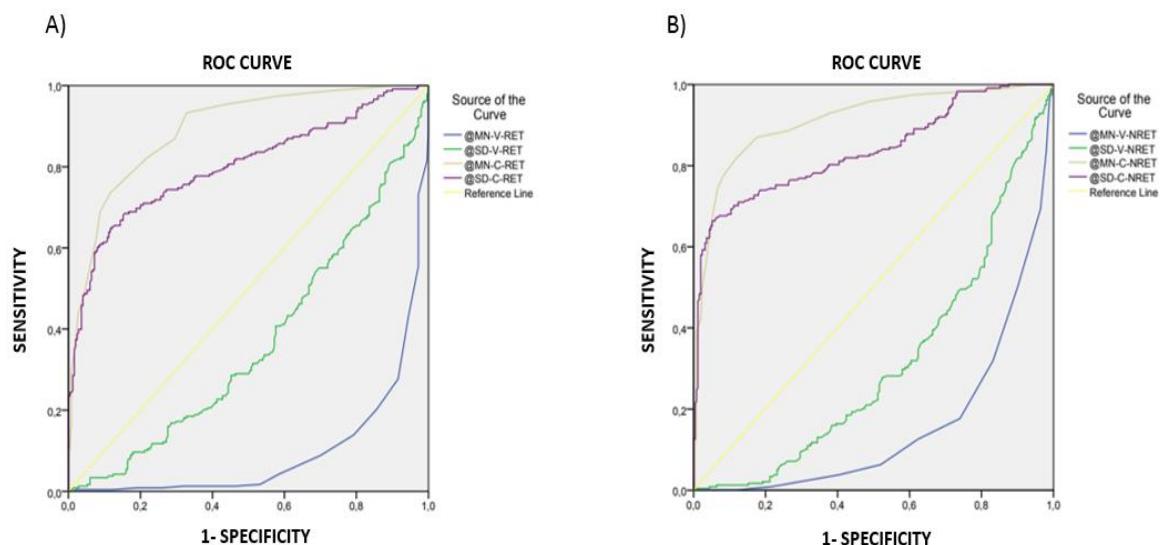
Los pacientes con AF mostraron valores significativamente más elevados que los pacientes con BT. La fórmula CMI descrita mostró una AUC de 0,98 (IC95%: 0,97-0,99;  $p<0,001$ ) y se obtuvo que un valor de **3,58** era el mejor punto de corte para distinguir

entre BT y AF, con una **sensibilidad**, **especificidad** e **índice de Youden** del **94,54%**, **94,8%** y **89,34%**, respectivamente. El diagrama de cajas de los dos grupos estudiados y la curva ROC de la fórmula CMI se pueden observar en la Figura 21.

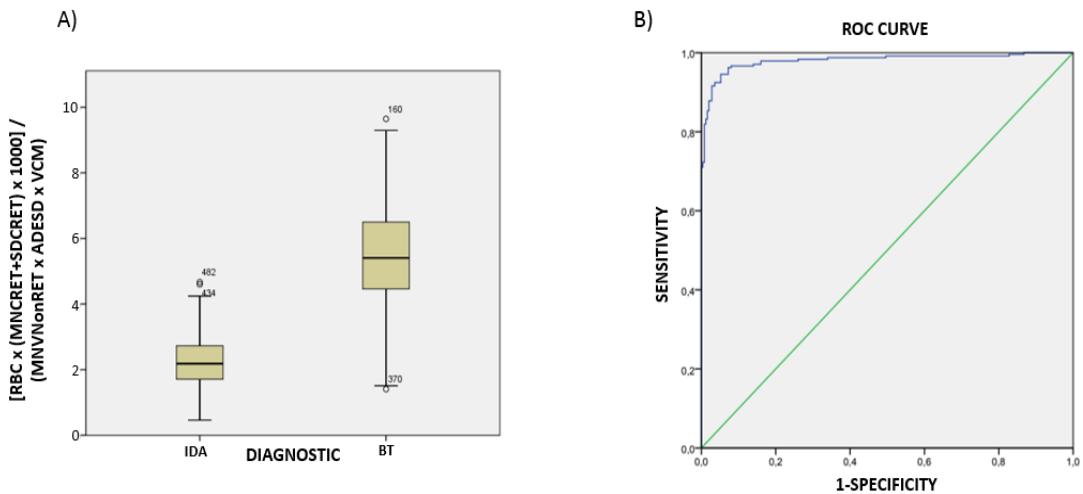
**Tabla 4. Rendimiento diagnóstico de CPDs individuales para diferenciar BT de AF.**

Magnitud	AUC	IC (95%)	p
<b>MN-V-RET</b>	0,91	0,88-0,93	<0,001
<b>SD-V-RET</b>	0,63	0,58-0,68	<0,001
<b>MN-C-RET</b>	0,89	0,86-0,92	<0,001
<b>SD-C-RET</b>	0,80	0,76-0,84	<0,001
<b>MN-V-NonRET</b>	0,84	0,81-0,88	<0,001
<b>SD-V-NonRET</b>	0,69	0,64-0,73	<0,001
<b>MN-C-NonRET</b>	0,91	0,88-0,94	<0,001
<b>SD-C-NonRET</b>	0,84	0,80-0,87	<0,001

**MN-V-RET:** Media del Volumen de Reticulocitos. **SD-V-RET:** Desviación Estándar del Volumen de Reticulocitos. **MN-C-RET:** Media de la Conductividad de Reticulocitos. **SD-C-RET:** Desviación Estándar de la Conductividad de Reticulocitos. **MN-V-NonRET:** Media del Volumen de No-Reticulocitos. **SD-V-NonRET:** Desviación Estándar del Volumen de No-Reticulocitos. **MN-C-NonRET:** Media del Conductividad de No-Reticulocitos. **SD-C-NonRET:** Desviación Estándar de la Conductividad de No-Reticulocitos.



**Figura 20. Curvas ROC de los CPDs de las poblaciones de RET (A) y NonRET (B).**



**Figura 21. Diagrama de cajas (A) y curva ROC (B) para la fórmula CMI (CPD Microcitosis Índice)= [RBC x (MNCRET+SDCRET) x 1000]/(MNVNonRET x RDWSD x MCV).**

Los resultados obtenidos con nuestra fórmula **CMI** se compararon con otros índices y fórmulas descritas en la literatura. La Tabla 6 muestra la sensibilidad, especificidad e índice de Youden de todas las fórmulas discriminatorias estudiadas. Todos los índices/fórmulas mostraron una AUC  $\geq 0,95$ , excepto Shine&Lal con una AUC=0,87. El mayor rendimiento diagnóstico, mediante AUC, se obtuvo aplicando nuestra fórmula **CMI** con un valor de **0,98**. Utilizando el punto de corte **>3,58** para el diagnóstico de BT, se obtuvo la mejor sensibilidad, especificidad e índice de Youden respecto al resto de fórmulas estudiadas.

El grupo de validación incluyó prospectivamente a 104 pacientes con anemia microcítica (VCM  $<80$  fL) e hipocroma (HCM  $<32$  pg). De ellos, 53 se diagnosticaron finalmente de AF y 51 de BT. El punto de corte de 3,58 obtenido en nuestra fórmula se utilizó para confirmar el rendimiento diagnóstico en el grupo de validación, mostrando una **sensibilidad del 96,1%**, una **especificidad del 92,5%** y un **índice de Youden del 0,88**. Únicamente 2 pacientes con BT fueron clasificados erróneamente como AF, obteniendo un valor muy cercano al punto de corte de 3,58 en ambos casos (3,44 y 3,53). Dentro del grupo de AF, 4 pacientes fueron erróneamente clasificados como BT cuando realmente correspondían a AF.

**Tabla 5. Rendimiento diagnóstico de los índices y fórmulas analizados en el estudio**

Fórmula	AUC (IC 95%)	Cutt-off (BT)	SEN (%)	ESP (%)	Índice Youden
England&Fraser	0,95 (0,93-0,97)	≤7,54	87,03	91,20	0,78
Mentzer	0,96 (0,94-0,97)	≤13,48	91,21	90,80	0,82
Srivastava	0,95 (0,92-0,97)	≤4,28	90,79	88,00	0,79
Green&King	0,97 (0,95-0,99)	≤70,37	89,12	98,00	0,87
Ricerca	0,95 (0,93-0,97)	≤3,37	86,61	93,60	0,80
Sirdah	0,96 (0,94-0,98)	≤31,01	93,31	89,20	0,83
Ehsani	0,96 (0,94-0,97)	≤16,60	88,28	91,60	0,80
Shine&Lal	0,87 (0,84-0,90)	≤1075,40	87,87	78,80	0,67
<b>CMI</b>	<b>0,98 (0,96-0,99)</b>	<b>&gt;3,58</b>	<b>94,54</b>	<b>94,80</b>	<b>0,89</b>

SEN: sensibilidad. ESP: especificidad. BT: β-talasemia. CMI: CPD Microcitosis Índice.

## 5.2. TRABAJO 2. EVALUACIÓN DE LOS *CELL POPULATION DATA* DE LA POBLACIÓN DE NEUTRÓFILOS EN EL DIAGNÓSTICO DE LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS.

A continuación, se detallan los resultados obtenidos en los 3 estudios que forman parte del segundo trabajo en el proyecto de tesis.

### 5.2.1. Estudio 2.1. Valoración de los *Cell Population Data* en pacientes con Síndrome Mielodisplásico.

Los pacientes con SMD mostraron significativamente una concentración absoluta de neutrófilos inferior a la de la población de sujetos normales (SMD:  $2,4 \pm 2,1 \times 10^3/\mu\text{L}$  vs GC:  $3,7 \pm 1,1 \times 10^3/\mu\text{L}$ ;  $p < 0,001$ ). En relación a los CPDs analizados, los neutrófilos de pacientes con SMD presentaron significativamente una disminución en el volumen (**V**) y en la conductividad (**C**) respecto a la población normal (Tabla 6). Sobre la dispersión de la luz láser, los pacientes con SMD mostraron una disminución significativa en los valores de la media posicional **MN** de los ángulos **MN-SU-NE** y **MN-AL2-NE**. A su vez, los valores en la variación **SD** de los ángulos medio y alto, **SD-SM-NE** y **SD-SU-NE**, respectivamente, se encontraron significativamente aumentados.

En relación al rendimiento diagnóstico, el CPD de conductividad **MN-C-NE**, junto a los CPDs de dispersión láser **SD-SM-NE** y **SD-SU-NE**, mostraron un buen rendimiento diagnóstico para el diagnóstico de SMD con una AUC  $> 0,800$  (Tabla 7). En la Figura 22 se representan gráficamente las curvas ROC de los CPDs con mejor rendimiento diagnóstico.

**Tabla 6. Comparación de medias de los CPDs entre los grupos estudiados.**

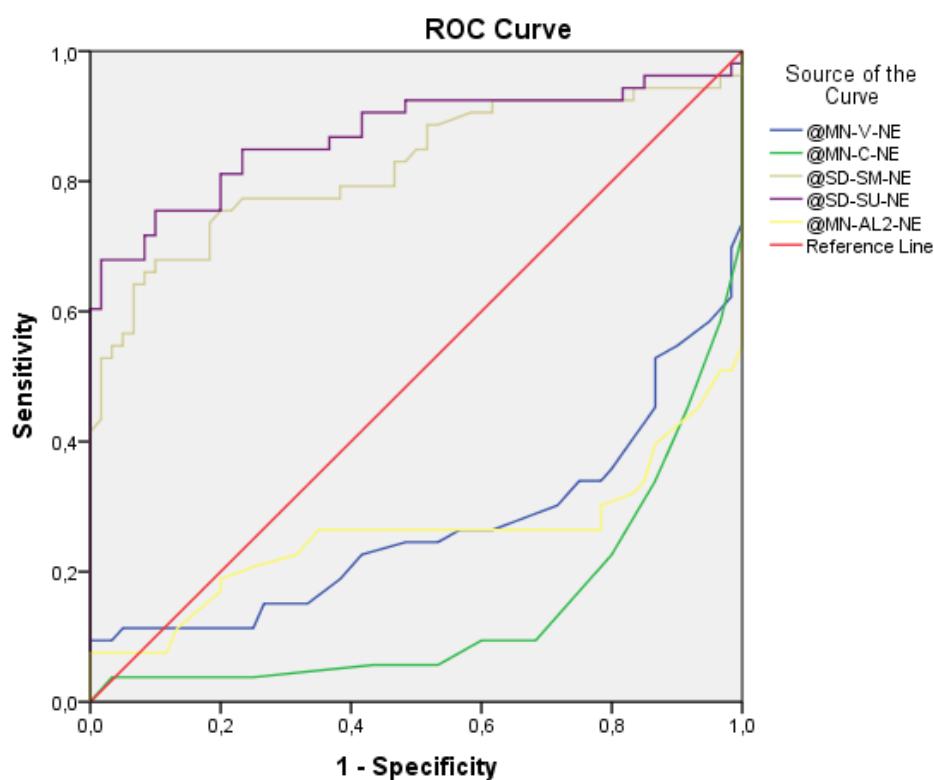
CPD	GC=60	SMD=54	Z	P
	M (IQ)	M (IQ)		
<b>MN-V-NE</b>	<b>156 (151,2-162,8)</b>	<b>147 (139-156)</b>	<b>-4,459</b>	<b>&lt;0,001*</b>
<b>SD-V-NE</b>	<b>20,2 (19,2-21,9)</b>	<b>18,5 (17,6-21,5)</b>	<b>-2,565</b>	<b>0,010</b>
<b>MN-C-NE</b>	<b>148 (144-149,8)</b>	<b>141 (138-143)</b>	<b>-6,476</b>	<b>&lt;0,001*</b>
<b>SD-C-NE</b>	<b>6,2 (5,6-7,0)</b>	<b>5,3 (4,7-6,0)</b>	<b>-4,030</b>	<b>0,001*</b>
<b>MN-SM-NE</b>	135 (131-137,8)	133 (127,5-137)	-1,492	0,136
<b>SD-SM-NE</b>	<b>10,0 (9,6-10,4)</b>	<b>11,7 (10,4-13,0)</b>	<b>-6,148</b>	<b>&lt;0,001*</b>
<b>MN-SU-NE</b>	<b>139 (136-142)</b>	<b>134 (130-138,2)</b>	<b>-3,703</b>	<b>&lt;0,001*</b>
<b>SD-SU-NE</b>	<b>10,5 (10,1-11,0)</b>	<b>13,2 (11,3-14,4)</b>	<b>-6,728</b>	<b>&lt;0,001*</b>
<b>MN-SL-NE</b>	129 (124,6-133,0)	129 (124,0-134,0)	-0,125	0,901
<b>SD-SL-NE</b>	13,8 (13,0-14,4)	14,0 (13,0-16,1)	-1,669	0,095
<b>MN-SA-NE</b>	163 (157-169)	157 (147,5-168,5)	-1,945	0,052
<b>SD-SA-NE</b>	30,1 (28,9-33,1)	30,2 (27,8-33,9)	-0,485	0,628
<b>MN-AL2-NE</b>	<b>153 (150-156,8)</b>	<b>144 (138,5-155)</b>	<b>-4,678</b>	<b>&lt;0,001*</b>
<b>SD-AL2-NE</b>	11,2 (10,5-12,4)	11,5 (10,3-13,7)	-0,899	0,368

\* Diferencias significativas ( $p<0.05$ ). **GC**: grupo control (sujetos normales). **SMD**: Pacientes con SMD. **Z**: estadístico U-Mann Whitney. **M**: mediana. **IQ**: intervalo intercuartil. **MN**: media CPD. **SD**: desviación estándar CPD. **NE**: neutrófilos. **V**: volumen. **C**: conductividad. **SM**: ángulo medio ( $9-43^0$ ). **SU**: ángulo alto ( $20-43^0$ ). **SL**: ángulo bajo ( $9-19^0$ ). **SA**: ángulo axial ( $5^0$ ). **AL2**: ángulo a  $0^0$ .

**Tabla 7. Valores de AUC para los CPD estudiados.**

CPD	AUC	IC 95%	p
<b>MN-V-NE</b>	0,750	0,648-0,844	<b>&lt;0,001*</b>
<b>MN-C-NE</b>	0,857	0,784-0,930	<b>&lt;0,001*</b>
<b>SD-SM-NE</b>	0,840	0,760-0,919	<b>&lt;0,001*</b>
<b>SD-SU-NE</b>	0,872	0,797-0,946	<b>&lt;0,001*</b>
<b>MN-AL2-NE</b>	0,758	0,656-0,860	<b>&lt;0,001*</b>

\*: Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). **AUC**: área bajo la curva. **IC**: intervalo de confianza. **MN**: media CPD. **SD**: desviación estándar CPD. **NE**: neutrófilos. **V**: volumen. **C**: conductividad. **SM**: ángulo medio ( $9-43^0$ ). **SU**: ángulo alto ( $20-43^0$ ). **SL**: ángulo bajo ( $9-19^0$ ). **SA**: ángulo axial ( $5^0$ ). **AL2**: ángulo a  $0^0$ .



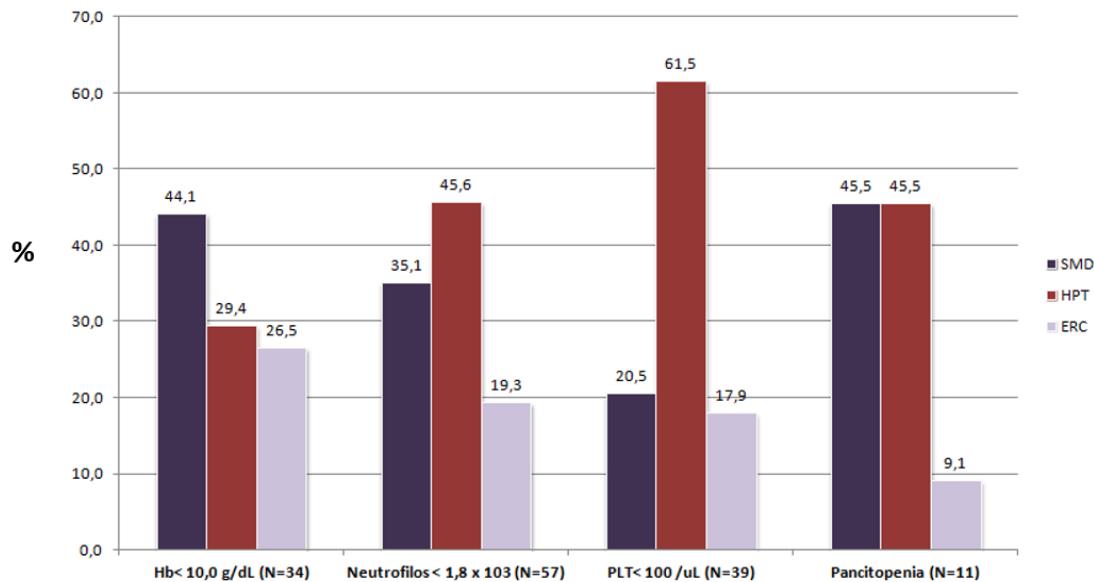
**Figura 22. Curvas ROC de los CPDs de neutrófilos con mejor rendimiento diagnóstico.**

## 5.2.2. Estudio 2.2. Distinción entre Síndromes Mielodisplásicos y citopenias no clonales mediante el estudio de *Cell Population Data*.

De los 102 pacientes estudiados en el segundo estudio, 34 presentaron una concentración de hemoglobina  $< 10$  g/dL, correspondiendo el 44% (N=15) de ellos a pacientes con SMD. Respecto al recuento absoluto de neutrófilos, 57 pacientes mostraron una concentración  $< 1,8 \times 10^9/L$ , siendo el 35% (N=20) de ellos pacientes con SMD. De los 39 pacientes que presentaban una concentración de plaquetas  $< 100 \times 10^9/L$ , destaca que el 61,5 % (N=24) eran pacientes con HPT. Once pacientes presentaban pancitopenia siendo el 45,5% (N=5) pacientes con SMD (Figura 23).

En la Tabla 8 se muestran los valores de todas las magnitudes analizadas entre los 3 grupos estudiados. Destaca que los SMD presentan una menor concentración de hemoglobina y de recuento de neutrófilos. Además, los pacientes con SMD mostraron una disminución estadísticamente significativa en los ángulos de dispersión MN-SM-NE (SMD:  $132,0 \pm 6,64$  vs HPT:  $141,1 \pm 5,6$  vs ERC  $137,7 \pm 8,7$ ;  $p < 0,001$ ), MN-SU-NE (SMD:  $132,5 \pm 8,0$  vs HPT:  $140,0 \pm 4,8$  vs ERC:  $137,7 \pm 6,3$ ;  $p < 0,001$ ) y MN-SL-NE (SMD:  $127,6 \pm 7,4$  vs HPT:  $137,0 \pm 7,9$  vs ERC:  $132,4 \pm 11,7$ ;  $p < 0,001$ ). En la Figura 24 se puede observar la distribución del diagrama de cajas para la MN posicional de los 3 ángulos de dispersión (SM, SU y SL) en los grupos estudiados.

En el análisis de rendimiento diagnóstico para identificar pacientes con SMD respecto otras citopenias no clonales (HPT + ERC), se observó que los CPDs de los ángulos de dispersión **MN-SM-NE** [0,818 (IC: 0,718-0,919;  $p < 0,001$ )] y **SD-SU-NE**: [0,825 (IC: 0,695-0,955;  $p < 0,001$ )] mostraron las mejores AUC, seguidos de los ángulos **MN-SU-NE** [0,782 (IC: 0,661-0,903;  $p < 0,001$ )] y **MN-SL-NE** [0,775 (IC: 0,671-0,879;  $p < 0,001$ )] que mostraron áreas muy cercanas a un 0,800 (Tabla 9). En la Figura 25 se muestra las gráficas de las curvas ROC para los ángulos de dispersión.



**Figura 23: Distribución de los pacientes según los criterios de cítopenias: hemoglobina <10 g/dL, recuento de neutrófilos < 1,8 x 10<sup>9</sup>/L y/o recuento de plaquetas < 100 x 10<sup>9</sup>/L.**

Entre las diferentes combinaciones evaluadas para mejorar el rendimiento individual de los CPDs (Tabla 10), la suma de 2 ángulos de complejidad celular, el **MN-SU-NE** y el **MN-SL-NE**, multiplicado por el porcentaje de neutrófilos fue la que consiguió una mejor AUC. Dicha combinación se ha denominado **índice SMD** y consiste en:

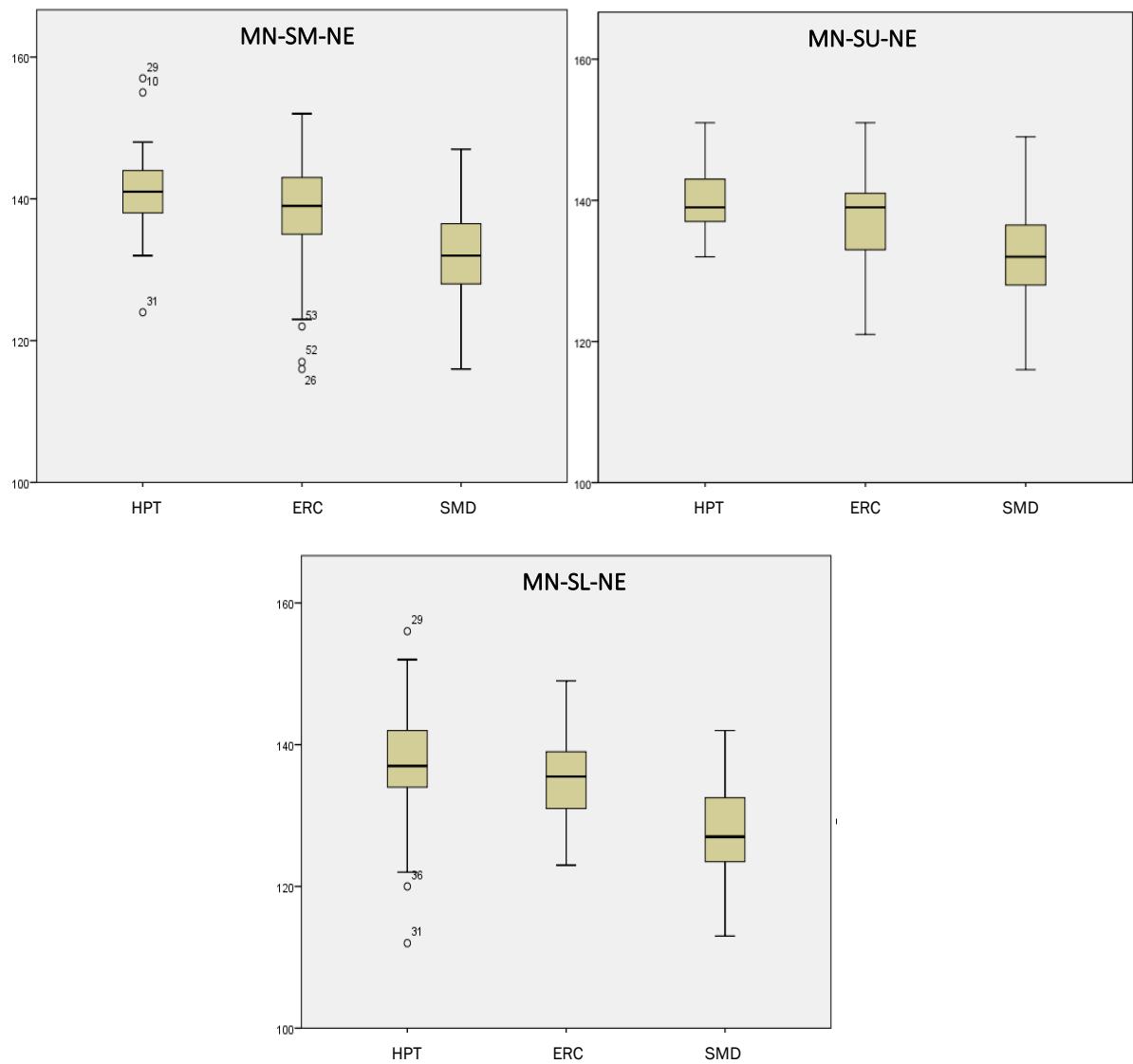
$$\text{Índice SMD} = [(MN\text{-}SU\text{-}NEU} + MN\text{-}SL\text{-}NEU) \times NEU\%] / 100$$

El **índice SMD** permite obtener el mayor rendimiento en la identificación de SMD de otras cítopenias no clonales, con un AUC de **0,911 (IC: 0,848 - 0,975; p <0,001)**. Un punto de corte en el **índice SMD** de **110,8** consigue una **sensibilidad** de **90,8%** y una **especificidad** de **78,3%** para la detección de SMD (Figura 26).

**Tabla 8. Comparación de medias de las magnitudes analizadas entre los tres grupos de pacientes estudiados.**

<b>Magnitud</b>	<b>SMD=23</b> ( $x \pm sd$ )	<b>HPT=48</b> ( $x \pm sd$ )	<b>ERC=31</b> ( $x \pm sd$ )	<b>P</b>
<b>Edad</b>	<b>73,6 ± 11,5</b>	<b>60,2 ± 14,6</b>	<b>61,4 ± 13,2</b>	<b>&lt;0,001*</b>
<b>Leucocitos (<math>\times 10^9/L</math>)</b>	3,02 ± 0,7	3,08 ± 0,7	3,2 ± 0,7	0,609
<b>Neutrófilos (<math>\times 10^9/L</math>)</b>	<b>1,1 ± 0,6</b>	<b>1,9 ± 0,6</b>	<b>1,7 ± 0,6</b>	<b>&lt;0,001*</b>
<b>Neutrófilos (%)</b>	<b>34,9 ± 13,4</b>	<b>56,3 ± 13,0</b>	<b>62,1 ± 16,1</b>	<b>&lt;0,001*</b>
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	<b>9,8 ± 2,0</b>	<b>11,9 ± 2,5</b>	<b>11,4 ± 2,0</b>	<b>&lt;0,001*</b>
<b>Plaquetas (<math>\times 10^9/L</math>)</b>	146,0 ± 77,1	120,9 ± 65,8	153,4 ± 57,5	0,082
<b>MN-V-NE</b>	149,3 ± 9,0	144,9 ± 5,1	148,2 ± 11,6	0,084
<b>SD-V-NE</b>	<b>20,3 ± 5,9</b>	<b>16,9 ± 1,4</b>	<b>20,9 ± 7,2</b>	<b>&lt;0,001*</b>
<b>MN-C-NE</b>	143,4 ± 4,9	144,3 ± 2,8	145,1 ± 4,7	0,326
<b>SD-C-NE</b>	<b>5,7 ± 1,4</b>	<b>5,1 ± 0,9</b>	<b>5,2 ± 0,7</b>	<b>0,016*</b>
<b>MN-SM-NE</b>	<b>132,0 ± 6,6</b>	<b>141,1 ± 5,6</b>	<b>137,7 ± 8,7</b>	<b>&lt;0,001*</b>
<b>SD-SM-NE</b>	11,6 ± 2,5	10,5 ± 2,5	11,1 ± 3,1	0,123
<b>MN-SU-NE</b>	<b>132,5 ± 8,0</b>	<b>140,0 ± 4,8</b>	<b>137,7 ± 6,3</b>	<b>&lt;0,001*</b>
<b>SD-SU-NE</b>	<b>12,8 ± 3,3</b>	<b>10,9 ± 2,7</b>	<b>11,1 ± 2,6</b>	<b>0,002*</b>
<b>MN-SL-NE</b>	<b>127,6 ± 7,4</b>	<b>137,0 ± 7,9</b>	<b>132,4 ± 11,7</b>	<b>&lt;0,001*</b>
<b>SD-SL-NE</b>	14,8 ± 2,9	14,2 ± 2,3	15,0 ± 3,3	0,398
<b>MN-SA-NE</b>	163,7 ± 15,0	168,0 ± 18,0	163,9 ± 18,6	0,495
<b>SD-SA-NE</b>	31,7 ± 5,9	31,8 ± 6,0	34,0 ± 6,8	0,199
<b>MN-AL2-NE</b>	147,8 ± 8,9	149,4 ± 7,5	150,9 ± 10,9	0,467

\* : Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). **SMD**: Pacientes con SMD. **HP**: pacientes con hepatopatía. **MN**: media CPD. **SD**: desviación estándar. **NE**: neutrófilos. **V**: volumen. **C**: conductividad. **SM**: ángulo medio ( $9-43^0$ ). **SU**: ángulo alto ( $20-43^0$ ). **SL**: ángulo bajo ( $9-19^0$ ). **SA**: ángulo axial ( $5^0$ ). **AL2**: ángulo a  $0^0$ .

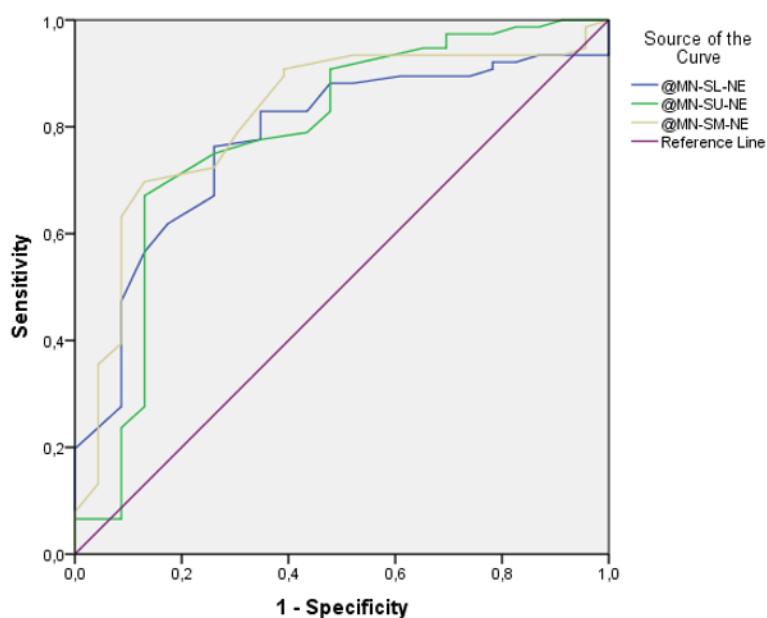


**Figura 24: Diagrama de cajas para los 3 ángulos de dispersión SM, SU y SL de neutrófilos en los grupos estudiados.**

**Tabla 9. Valores de AUC para los CPD estudiados.**

Fórmula	AUC	IC 95%	<i>p</i>
<b>MN-V-NE</b>	0,604	0,448-0,760	0,078
<b>SD-V-NE</b>	<b>0,695</b>	<b>0,565-0,824</b>	<b>0,008*</b>
<b>MN-C-NE</b>	0,623	0,465-0,781	0,076
<b>SD-C-NE</b>	<b>0,708</b>	<b>0,570-0,845</b>	<b>0,004*</b>
<b>MN-SM-NE</b>	<b>0,818</b>	<b>0,718-0,919</b>	<b>&lt;0,001*</b>
<b>SD-SM-NE</b>	<b>0,684</b>	<b>0,541-0,826</b>	<b>0,012*</b>
<b>MN-SU-NE</b>	<b>0,782</b>	<b>0,661-0,903</b>	<b>&lt;0,001*</b>
<b>SD-SU-NE</b>	<b>0,825</b>	<b>0,695-0,955</b>	<b>&lt;0,001*</b>
<b>MN-SL-NE</b>	<b>0,775</b>	<b>0,671-0,879</b>	<b>&lt;0,001*</b>
<b>SD-SL-NE</b>	0,537	0,390-0,684	0,613
<b>MN-SA-NE</b>	0,562	0,430-0,694	0,339
<b>SD-SA-NE</b>	0,511	0,366-0,656	0,882
<b>MN-AL2-NE</b>	0,555	0,413-0,696	0,711
<b>SD-AL2-NE</b>	0,542	0,403-0,682	0,561

\*: Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). **AUC**: área bajo la curva. **IC**: intervalo de confianza. **MN**: media CPD. **SD**: desviación estándar CPD. **NE**: neutrófilos. **V**: volumen. **C**: conductividad. **SM**: ángulo medio ( $9-43^\circ$ ). **SU**: ángulo alto ( $20-43^\circ$ ). **SL**: ángulo bajo ( $9-19^\circ$ ). **SA**: ángulo axial ( $5^\circ$ ). **AL2**: ángulo a  $0^\circ$ .

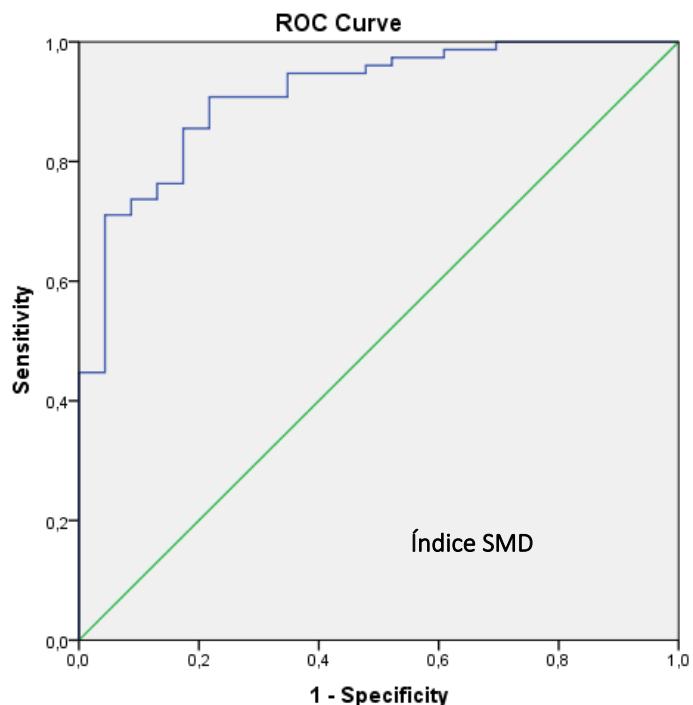


**Figura 25: Curvas ROC de los 3 ángulos de dispersión SM, SU y SL de neutrófilos.**

**Tabla 10. Valores de AUC para las combinaciones evaluadas.**

Fórmula	Descripción	AUC	IC 95%	p
<b>Suma MN</b>	<b>MN-SM-NE + MN-SU-NE + MN-SL-NE</b>	<b>0,850</b>	<b>0,765-0,936</b>	<b>&lt;0,001*</b>
<b>Suma SD</b>	<b>SD-SM-NE + SD-SU-NE + SD-SL-NE</b>	<b>0,701</b>	<b>0,562-0,839</b>	<b>0,006*</b>
<b>Cociente MN/SD</b>	<b>(MN-SM-NE + MN-SU-NE + MN-SL-NE) / (SD-SM-NE + SD-SU-NE + SD-SL-NE)</b>	<b>0,778</b>	<b>0,655-0,902</b>	<b>&lt;0,001*</b>
<b>Índice SMD</b>	<b>[(MN-SU-NE + MN-SL-NE) x NE%] / 100</b>	<b>0,911</b>	<b>0,848-0,975</b>	<b>&lt;0,001*</b>

\*: Diferencias significativas ( $p<0,05$ ). **AUC**: área bajo la curva. **IC**: intervalo de confianza. **MN**: media posicional CPD. **SD**: desviación estándar CPD. **NE**: neutrófilos. **SM**: ángulo medio ( $9-43^0$ ). **SU**: ángulo alto ( $20-43^0$ ). **SL**: ángulo bajo ( $9-19^0$ ).



**Figura 26: Curva ROC del Índice SMD.**

### 5.2.3. Estudio 2.3. Detección de disgranulopoyesis: utilidad de los *Cell Population Data* de la población de neutrófilos.

Al igual que en los estudios previos, la mayoría de CPDs de la población de neutrófilos mostraron diferencias significativas entre los dos grupos estudiados (Tabla 11). Los resultados indican que los pacientes con SMD presentan una mayor variación en el volumen celular (**SD-V-NE**) y una menor conductividad (**MN-C-NE**) en la población de neutrófilos respecto al grupo control. Además, los neutrófilos de los pacientes con SMD muestran una disminución en el valor medio de distintos ángulos (**MN-SM-NE, MN-SU-NE, MN-SL-NE**) con una mayor dispersión en ellos (**SD-SM-NE y SD-SU-NE**), reflejando una menor complejidad celular.

Respecto al análisis de correlación (Tabla 12) entre los CPDs y el % de neutrófilos HGRAN y HSEG, los CPDs de volumen (**MN-V-NE** y **SD-V-NE**), conductividad (**MN-C-NE** y **SD-MN-NE**) y dispersión láser del ángulo medio (**MN-SM-NE** y **SD-SM-NE**) y alto (**MN-SU-NE** y **SD-SU-NE**), correlacionan significativamente con el porcentaje de neutrófilos hipogranulados. Por otro lado, mientras que el % de neutrófilos hiposegmentados mantiene la correlación significativa con los CPDs de volumen (**MN-V-NE** y **SD-V-NE**) y conductividad (**MN-C-NE**), no muestran buena correlación con los CPDs de dispersión láser (excepto el ángulo **SD-SU-NE**), indicando que probablemente la segmentación del núcleo en la población de neutrófilos no viene determinada por esos ángulos.

En el estudio de comparación entre las muestras que presentaban un grado de displasia significativa (>10%), se puede observar cómo los CPDs de dispersión láser (**MN-SM-NE, MN-SU-NE, MN-SL-NE** y **MN-SA-NE**) mostraban valores significativamente más bajos en aquellas muestras con >10% de neutrófilos hipogranulados que en las muestras con <10%. Por el contrario, y en concordancia con el análisis de correlación, respecto al grado de displasia por neutrófilos hiposegmentados, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 13).

En relación al rendimiento diagnóstico para determinar el grado de displasia significativa, los CPDs de dispersión láser **MN-SM-NE** y **MN-SU-NE** mostraron el mejor rendimiento

diagnóstico para predecir la presencia de > 10% de neutrófilos hipogranulados [**MN-SM-NE**: 0,852 (IC95%: 0,731-0,974) y **MN-SU-NE**: 0,845 (IC95%: 0,675-0,953)]. En relación al grado de neutrófilos hiposegmentados, los CPDs no mostraron rendimientos significativos.

**Tabla 11. Comparación de los CPDs entre los grupos estudiados.**

CPD	SMD M (IQ)	GC M (IQ)
<b>MN-V-NE</b>	<b>153 (145-176,5)</b>	<b>149 (139,3-163,8) *</b>
<b>SD-V-NE</b>	<b>23,03 (20,4-28,7) *</b>	<b>18,32 (17,5-20) *</b>
<b>MN-C-NE</b>	<b>139 (135,5-142,5) *</b>	<b>143 (142-144) *</b>
<b>SD-C-NE</b>	<b>5,7 (5,1-6,6) *</b>	<b>4,8 (4,4-5,3) *</b>
<b>MN-SM-NE</b>	<b>129 (120,5-133) *</b>	<b>136 (132,5-141,5) *</b>
<b>SD-SM-NE</b>	<b>12,5 (11,3-13,9) *</b>	<b>10,5 (10,2-11,3) *</b>
<b>MN-SU-NE</b>	<b>131 (122,5-133) *</b>	<b>137 (134-142) *</b>
<b>SD-SU-NE</b>	<b>15,2 (13,4-17,6) *</b>	<b>11,2 (10,8-12) *</b>
<b>MN-SL-NE</b>	<b>121 (115-126) *</b>	<b>129 (126-137) *</b>
<b>SD-SL-NE</b>	14,7 (13,3-16,7)	14,3 (13,7-15,2)
<b>MN-SA-NE</b>	149 (135-162,5)	145 (137-157)
<b>SD-SA-NE</b>	<b>33,8 (30,5-37,2) *</b>	<b>30,4 (28,1-33,1) *</b>
<b>MN-AL2-NE</b>	133 (121-161)	138 (130-144)
<b>SD-AL2-NE</b>	<b>17,3 (14,4-20,1) *</b>	<b>12,3 (11,7-14,4) *</b>

\* Diferencias significativas ( $p<0,05$ ). **GC**: grupo control (sujetos normales). **SMD**: Pacientes con SMD. **M**: mediana. **IQ**: intervalo intercuartil. **MN**: media CPD. **SD**: desviación estándar CPD. **NE**: neutrófilos. **V**: volumen. **C**: conductividad. **SM**: ángulo medio ( $9-43^0$ ). **SU**: ángulo alto ( $20-43^0$ ). **SL**: ángulo bajo ( $9-19^0$ ). **SA**: ángulo axial ( $5^0$ ). **AL2**: ángulo a  $0^0$ .

**Tabla 12. Correlación entre CPDs y porcentaje de neutrófilos hipogranulados e hiposegmentados.**

CPD		% HGRAN	% HSEG
<b>MN-V-NE</b>	r	<b>0,630**</b>	<b>0,724**</b>
<b>SD-V-NE</b>	r	<b>0,753**</b>	<b>0,727**</b>
<b>MN-C-NE</b>	r	<b>-0,458**</b>	<b>-0,454**</b>
<b>SD-C-NE</b>	r	<b>0,361**</b>	0,167
<b>MN-SM-NE</b>	r	<b>-0,422**</b>	-0,067
<b>SD-SM-NE</b>	r	<b>0,271*</b>	0,022
<b>MN-SU-NE</b>	r	<b>-0,356**</b>	-0,019
<b>SD-SU-NE</b>	r	<b>0,608**</b>	<b>0,430**</b>
<b>MN-SL-NE</b>	r	-0,079	0,06
<b>SD-SL-NE</b>	r	-0,011	-0,303
<b>MN-SA-NE</b>	r	0,110	0,245
<b>SD-SA-NE</b>	r	0,083	0,072
<b>MN-AL2-NE</b>	r	<b>0,348**</b>	<b>0,372**</b>
<b>SD-AL2-NE</b>	r	<b>0,365**</b>	<b>0,297**</b>

\*\* Diferencias significativas  $p < 0,001$ ; \*Diferencias significativas  $p < 0,05$ ; **r**: coeficiente correlación Spearman; **HGRAN**: neutrófilos hipogranulados; **HSEG**: neutrófilos hiposegmentados. **MN**: media CPD. **SD**: desviación estándar CPD. **NE**: neutrófilos. **V**: volumen. **C**: conductividad. **SM**: ángulo medio ( $9-43^{\circ}$ ). **SU**: ángulo alto ( $20-43^{\circ}$ ). **SL**: ángulo bajo ( $9-19^{\circ}$ ). **SA**: ángulo axial ( $5^{\circ}$ ). **AL2**: ángulo a  $0^{\circ}$ .

**Tabla 13. Diferencias entre CPDs y displasia significativa (>10%) de neutrófilos hipogranulados e hiposegmentados.**

CPD	HGRAN <10%	HGRAN > 10%	<i>p</i>	HSEG < 10%	HSEG > 10%	<i>p</i>
<b>MN-V-NE</b>	150,5 [146,3-156,5]	147,0 [133,0-170,8]	0,410	147,0 [138,5-157,0]	149,0 [139,0-172,8]	0,485
<b>MN-C-NE</b>	138,0 [135,0-144,3]	138,0 [135,3-141,0]	0,697	139,5 [137,8-142,0]	137,0 [133,0-140,3]	0,08
<b>MN-SM-NE</b>	<b>134,0</b> [129,3-138,0]	<b>118,5</b> [110,3-131,3]	< 0,001*	128,5 [113,3-135,5]	123 [115,3-133,0]	0,526
<b>MN-SU-NE</b>	<b>135,0</b> [129,0-137,8]	<b>117,5</b> [109,3-130,8]	< 0,001*	129,5 [114,5-134,5]	124,5 [113,0-134,5]	0,581
<b>MN-SL-NE</b>	<b>125,5</b> [124,0-128,5]	<b>112,0</b> [104,3-124,0]	0,002*	122,5 [105,8-128,3]	118,5 [106,8-125,3]	0,417
<b>MN-SA-NE</b>	<b>152,0</b> [146,3-158,8]	<b>130,0</b> [115,5-146,8]	0,003*	147,0 [129,3-160,5]	140,5 [117,8-150,5]	0,194
<b>MN-AL2-NE</b>	130,5 [125,8-143,3]	129,0 [122,3-141,0]	0,562	131,0 [124,5-135,0]	130,0 [124,0-148,0]	0,783

\* Diferencias significativas (*p*<0,05). **HGRAN**: neutrófilos hipogranulados. **HSEG**: neutrófilos hiposegmentados. **M**: mediana. **IQ**: intervalo intercuartil. **MN**: media CPD. **SD**: desviación estándar CPD. **NE**: neutrófilos. **V**: volumen. **C**: conductividad. **SM**: ángulo medio (9-43°). **SU**: ángulo alto (20-43°). **SL**: ángulo bajo (9-19°). **SA**: ángulo axial (5°). **AL2**: ángulo a 0°.

## **5.3. TRABAJO 3. EVALUACIÓN DE LOS *CELL POPULATION DATA* DE LA POBLACIÓN DE MONOCITOS EN EL DIAGNÓSTICO PRECOZ DE SEPSIS.**

En relación al tercer trabajo de la tesis, a continuación, se enumeran los resultados obtenidos en los tres estudios que forman parte.

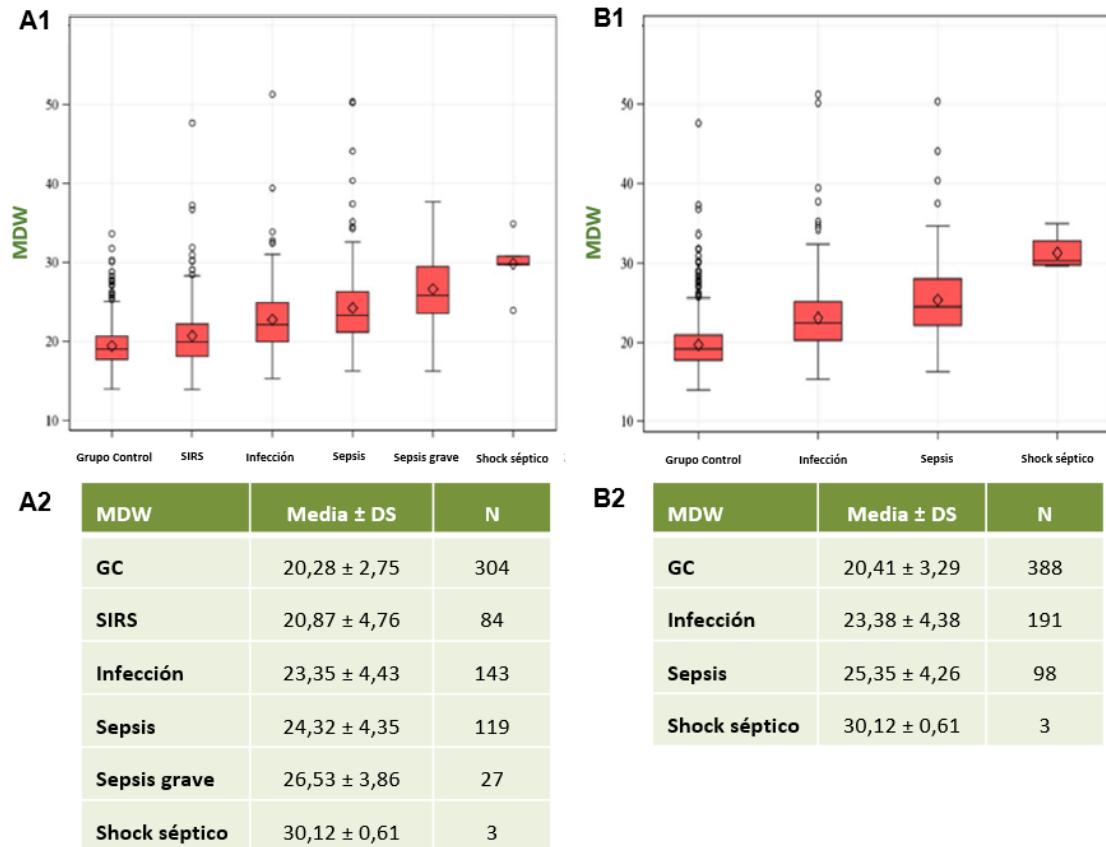
### **5.3.1. Estudio 3.1. Evaluación del MDW en el diagnóstico precoz de sepsis en pacientes que acuden a urgencias.**

Independientemente de los criterios para la clasificación de sepsis (SEPSIS-2 o SEPSIS-3), los valores de MDW fueron superiores en el grupo de pacientes sépticos frente a los no sépticos, aumentando su valor a medida que incrementa la gravedad de la sepsis (Figura 27). El MDW mostró una AUC de 0,81 (IC95%: 0,78-0,84) para la detección de sepsis según los criterios de SEPSIS-2, incrementando hasta 0,86 (IC95%: 0,84-0,88) cuando se combina con el recuento de leucocitos totales (LEU). Para los criterios de SEPSIS-3, el AUC del MDW fue de 0,82 (IC95%: 0,79-0,85). Es importante destacar los resultados obtenidos en el análisis realizado en el grupo de pacientes con baja sospecha de sepsis. Según SEPSIS-2, en este subgrupo el MDW obtuvo una AUC de 0,83 (IC95%: 0,75-0,91), llegando a 0,90 (IC95%: 0,84-0,95) cuando se combina con LEU.

Los resultados obtenidos en el estudio validaron un nuevo punto de corte del MDW para la identificación de sepsis en tubos EDTAK3. Un valor de MDW de 21,5 (en EDTAK2 fue 20,0) proporcionó un rendimiento diagnóstico óptimo, con una sensibilidad de 75%, una especificidad de 73%, un valor predictivo positivo de 36% y un importante valor predictivo negativo de 93% para el diagnóstico de sepsis.

En el análisis de comparación entre biomarcadores, la combinación del MDW y LEU mostró un AUC de 0,86 (IC95%: 0,84-0,88), similar a la PCR [AUC: 0,85 (IC95%: 0,83-0,87)] y superior a la PCT [AUC: 0,78 (IC95%: 0,75-0,81)]. Añadir la PCR o la PCT a la combinación entre MDW y LEU obtenida en el hemograma no incrementó el poder diagnóstico (Tabla 14). Los resultados del estudio realizado confirman que un valor alterado de MDW > 21,5

incrementa de manera significativa la probabilidad de sepsis, independientemente del criterio diagnóstico (SEPSIS-2 o SEPSIS-3).



**Figura 27. Diagrama de cajas y valores de MDW para la clasificación de sepsis según los criterios de SEPSIS-2 (A1 y A2) y SEPSIS-3 (B1 y B2). MDW: Monocyte Distribution Width. SIRS: síndrome de respuesta inflamatoria sistémica. GC: Grupo Control. DS: desviación estándar.**

**Tabla 14. Comparación del rendimiento del MDW individual y diferentes combinaciones de biomarcadores**

Biomarcador	AUC (95% IC)	Sensibilidad (95% IC)	Especificidad (95% IC)	VPP (95% IC)	VPN (95% IC)	LR+ (95% IC)	LR- (95% IC)
<b>SEPSIS-2</b>							
<b>MDW</b>	0,814 (0,78-0,84)	75,2 (69,4-80,3)	73,1 (70,0 – 75,2)	36,5 (31,8 – 39,9)	93,4 (92,1-95,3)	2,8 (2,5-3,1)	0,3 (0,2-0,4)
<b>LEU</b>	0,760 (0,721-0,794)	69,0 (63,1 – 74,2)	83,5 (81,8 – 85,4)	45,1 (40,0 – 50,7)	93,5 (91,8 – 94,8)	4,3 (3,5 – 4,6)	0,4 (0,3 – 0,5)
<b>PCR</b>	0,852 (0,834-0,870)	85,3 (80,4 – 88,1)	72,4 (70,1 – 74,9)	39,4 (34,9 – 43,8)	96,2 (94,0 – 97,5)	3,1 (2,8 – 3,4)	0,2 (0,1-0,3)
<b>PCT</b>	0,783 (0,754-0,810)	45,0 (38,9 – 51,4)	88,4 (86,3 – 90,0)	44,3 (38,0 – 50,1)	89,0 (87,1 – 90,3)	3,8 (3,1 – 4,7)	0,6 (0,5 – 0,7)
<b>MDW+LEU</b>	0,867 (0,844-0,881)	-	-	-	-	-	-
<b>MDW+PCR</b>	0,856 (0,821-0,878)	-	-	-	-	-	-
<b>MDW+PCT</b>	0,810 (0,785-0,846)	-	-	-	-	-	-
<b>MDW+LEU+PCT</b>	0,865 (0,841-0,890)	-	-	-	-	-	-
<b>MDW+LEU+PCR</b>	0,874 (0,857-0,892)	-	-	-	-	-	-
<b>SEPSIS-3</b>							
<b>MDW</b>	0,824 (0,790-0,853)	81,2 (73,4-86,1)	68,7 (66,9 – 72,2)	22,4 (18,0 – 25,1)	97,4 (96,1-98,3)	2,6 (2,4-2,9)	0,3 (0,2-0,4)
<b>LEU</b>	0,653 (0,604-0,703)	49,0 (40,9 – 57,2)	77,2 (74,1 – 79,0)	18,3 (14,8 – 22,2)	93,7 (91,8 – 94,8)	2,1 (1,7 – 2,5)	0,7 (0,6 – 0,8)
<b>PCR</b>	0,852 (0,818-0,874)	89,3 (82,7 – 92,8)	68,3 (66,0 – 70,9)	23,2 (19,4 – 26,0)	98,2 (97,0 – 98,7)	2,8 (2,5 – 3,1)	0,2 (0,1-0,3)
<b>PCT</b>	0,844 (0,803-0,869)	60,1 (52,4 – 68,4)	87,4 (85,1 – 89,0)	33,3 (27,1 – 39,2)	95,4 (94,1 – 96,3)	4,6 (3,8 – 5,6)	0,5 (0,4 – 0,6)
<b>MDW+LEU</b>	0,830 (0,794-0,863)	-	-	-	-	-	-
<b>MDW+PCR</b>	0,852 (0,821-0,880)	-	-	-	-	-	-
<b>MDW+PCT</b>	0,823 (0,788-0,859)	-	-	-	-	-	-
<b>MDW+LEU+PCT</b>	0,830 (0,804-0,857)	-	-	-	-	-	-
<b>MDW+LEU+PCR</b>	0,851 (0,821-0,870)	-	-	-	-	-	-

**MDW:** Monocyte Distribution Width. **LEU:** leucocitos totales. **PCR:** Proteína C reactiva. **PCT:** Procalcitonina. **AUC:** Área bajo la curva. **PPV:** valor predictivo positivo. **VPN:** valor predictivo negativo. **LR+:** cociente de probabilidad positivo **LR-:** cociente de probabilidad negativo.

### **5.3.2. Estudio 3.2. Utilidad del MDW en el diagnóstico y pronóstico de pacientes con sepsis que ingresan en UCI.**

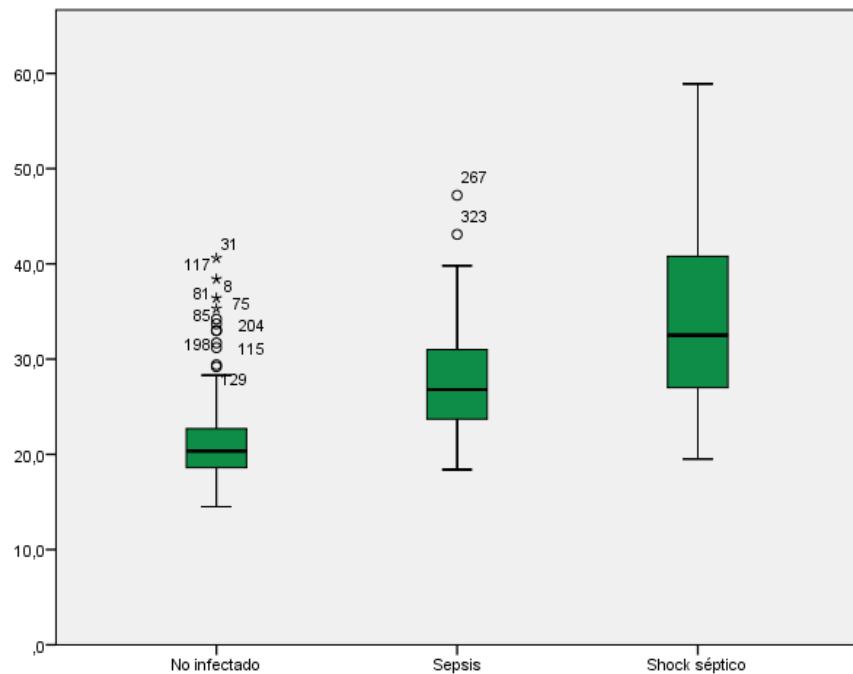
En el segundo estudio se incluyeron un total de 364 pacientes, de los cuales se excluyeron posteriormente 20 por no cumplir con los criterios de inclusión. El análisis final incluyó 344 pacientes con una edad mediana de 59 años (47-69) y las mujeres representaron el 37,8% de la serie. Las características demográficas y los resultados clínico/analíticos se muestran en la Tabla 15. Según los criterios para SEPSIS-3, 200 pacientes (58,1%) se categorizaron como no sépticos, 76 (22,1%) como sepsis y 68 (19,8%) como shock séptico. El diagnóstico de sepsis durante el estudio mostró una prevalencia del 46,4%.

Los resultados del MDW al ingreso en UCI fueron significativamente más elevados en el grupo de pacientes sépticos que en el de no-sépticos [sepsis: 29,7 (24,7-35,7) vs no-sepsis: 20,4 (18,6-22,7);  $p<0,001$ ]. El valor del MDW incrementa en los 3 grupos estudiados (no sepsis, sepsis y shock séptico) en función de la gravedad clínica de los pacientes (Figura 28). Al ingreso, el MDW de pacientes no sépticos fue de 20,4 (18,6-22,7), para sépticos de 26,8 (23,7-31,2) y para shock-séptico de 32,5 (26,9-40,9) ( $p <0,001$ ). Además, al ingreso en UCI los valores de MDW correlacionan positivamente con las escalas de disfunción orgánica (SOFA:  $r=0,422$ ;  $p <0,001$ ) y de severidad (APACHE;  $r=0,206$ ;  $p <0,01$ ).

**Tabla 15. Características demográficas, escalas de gravedad y resultados de biomarcadores según el diagnóstico de sepsis.**

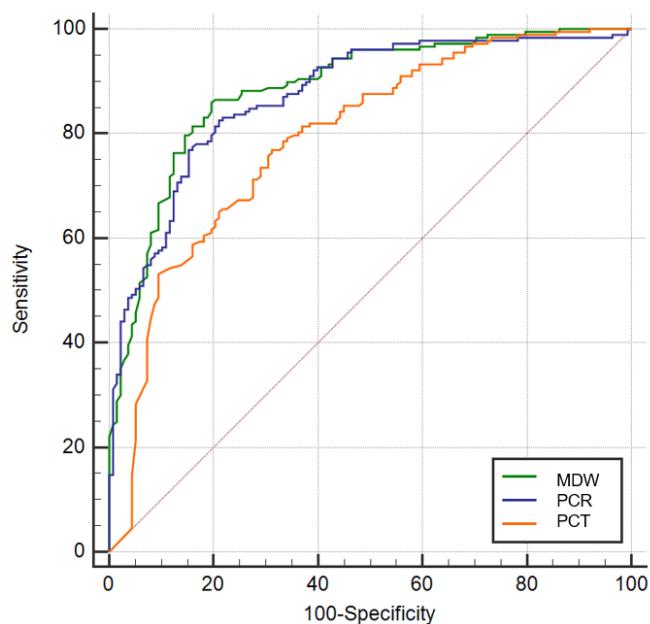
	Total	No-Sepsis	Sepsis	Shock Séptico	<i>p</i>
<b>Pacientes totales</b>	344	200	76	68	
<b>Edad, años</b>	59 (47-69)	56 (45-68)	60 (50-70)	66 (52-75)	<0,001
<b>Sexo femenino, no. (%)</b>	130 (37,8%)	74 (37,0)	28 (36,8)	28 (41,2)	0,857
<b>SOFA score</b>	7,0 (3,0-9,0)	5,0 (2,0-8,0)	7,0 (4,0-9,0)	9,5 (7-12)	<0,001
<b>APACHE II score</b>	16,0 (11,0-22,0)	15,0 (9,3-20,0)	15,0 (11,0-20,0)	20,5 (14,0-24,0)	<0,001
<b>Leucocitos x 10<sup>9</sup>/L</b>	11,6 (8,6-16,0)	11,7 (9,4-14,7)	9,6 (6,9-16,0)	12,9 (7,7-20,2)	<0,001
<b>MDW</b>	22,7 (19,6-29,5)	20,4 (18,6-22,7)	26,9 (23,7-31,2)	32,6 (26,9-40,9)	<0,001
<b>PCR mg/L</b>	80,2 (15,6-201,0)	26,5 (7,2-79,2)	144,8 (80,6-269,8)	249,5 (170,4-356,0)	<0,001
<b>PCT ng/mL</b>	0,46 (0,07-4,9)	0,12 (0,04-0,85)	1,1 (0,2-4,1)	10,3 (1,9-30,0)	<0,001

**SOFA:** sequential organ failure assessment. **APACHE:** acute physiology and chronic health evaluation II. **MDW:** Monocyte Distribution Width. **PCT:** procalcitonina. **PCR:** proteína C reactiva.



**Figura 28: Diagrama de cajas para el MDW en la clasificación de sepsis según los criterios de Sepsis 3.**

En relación al rendimiento diagnóstico, el MDW demostró una buena capacidad diagnóstica para identificar a los pacientes con sepsis en la UCI, con AUC de 0,877 (IC 95%: 0,841-0,914). El valor de MDW con mejor capacidad diagnóstica, calculado mediante el índice de Youden, fue de 24,2, mostrando una sensibilidad del 80,6% (IC 95%: 73,1-86,7) y una especificidad del 84,5% (IC 95%: 78,7-89,2). El cociente de probabilidad positivo (LR+) fue de 5,20 (IC 95%: 3,70-7,30) y el negativo (LR-) de 0,23 (IC 95%: 0,20-0,30). En cuanto a las curvas ROC para la detección de sepsis, el MDW demostró un rendimiento similar al de la PCR [0,871 (IC 95%: 0,833-0,909)] y superior al de la PCT [0,787 (IC 95%: 0,736-0,838)] (Figura 29). Añadir la determinación de LEU [AUC para LEU 0,480 (IC 95%: 0,414-0,547)] a la medición de MDW no mejoró el rendimiento [MDW+LEU: 0,877 (IC95%: 0,838-0,910)] para el diagnóstico de SEPSIS-3. La combinación de dos biomarcadores con el mejor AUC fue MDW más PCR [MDW+ PCR: 0,909 (IC95%: 0,873-0,938)]. Sin embargo, ninguna de las diferentes combinaciones analizadas mejoró el rendimiento diagnóstico que el MDW por sí solo, tal y como se puede comprobar en los intervalos de confianza (Tabla 16).



**Figura 29. Curvas ROC de rendimiento para el MDW, PCR y PCT en el diagnóstico de sepsis. MDW: Monocyte Distribution Width. PCR: Proteína C reactiva. PCT: Procalcitonina.**

**Tabla 16. Rendimiento diagnóstico de los diferentes biomarcadores y sus combinaciones.**

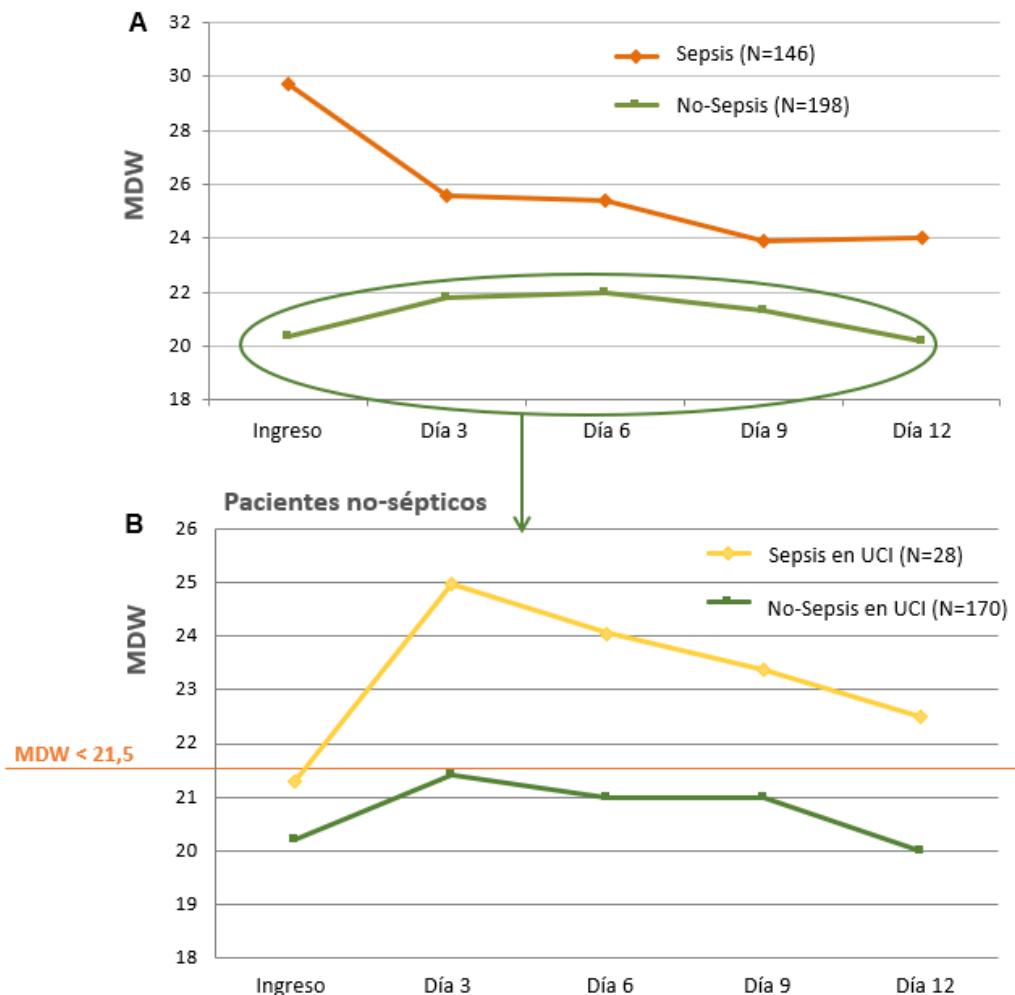
Biomarcador	AUC	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN	LR+	LR-
	(95% IC)	(95% IC)	(95% IC)	(95% IC)	(95% IC)	(95% IC)	(95% IC)
<b>MDW</b>	0,877 (0,841-0,914)	80,6 (73,1-86,7)	84,5 (78,7 – 89,2)	78,6 (72,5 – 83,7)	86,0 (81,4-89,6)	5,20 (3,7-7,3)	0,23 (0,2-0,3)
<b>LEU</b>	0,480 (0,414-0,547)	84,2 (78,5 - 89,0)	34,2 (26,8 – 42,1)	47,9 (44,7 – 51,1)	75,1 (67,3 – 81,6)	1,28 (1,1 – 1,5)	0,46 (0,3 – 0,7)
<b>PCR</b>	0,871 (0,833-0,909)	81,3 (74,2 – 87,1)	81,44 (75,2 – 86,7)	75,9 (69,9 – 81,0)	85,8 (81,3 – 89,4)	4,38 (3,2 - 5,9)	0,23 (0,2-0,3)
<b>PCT</b>	0,787 (0,736-0,838)	70,6 (62,7 – 77,7)	76,5 (69,7 – 82,4)	68,3 (62,0 – 74,0)	78,4 (73,7 – 82,4)	3,00 (2,3 - 4,0)	0,38 (0,3 – 0,5)
<b>MDW+LEU</b>	0,877 (0,838-0,910)	-	-	-	-	-	-
<b>MDW+PCR</b>	0,909 (0,873-0,938)	-	-	-	-	-	-
<b>MDW+PCT</b>	0,891 (0,852-0,923)	-	-	-	-	-	-
<b>PCR+PCT</b>	0,891 (0,852-0,922)	-	-	-	-	-	-
<b>MDW+PCR+PCT</b>	0,917 (0,881-0,945)	-	-	-	-	-	-

**MDW:** Monocyte Distribution Width. **LEU:** leucocitos totales. **PCR:** Proteína C reactiva. **PCT:** Procalcitonina. **AUC:** Área bajo la curva. **PPV:** valor predictivo positivo. **VPN:** valor predictivo negativo. **LR+:** cociente de probabilidad positivo **LR-:** cociente de probabilidad negativo.

El punto de corte de MDW de 21,5, recomendado para el diagnóstico de pacientes que acuden a urgencias, mostró una sensibilidad del 89,9% (IC 95%: 82,6-93,5) y una especificidad del 66,5% (IC 95%: 59,5-73,0). El cociente de probabilidad positivo (LR+) fue de 2,65 (IC 95%: 2,20-3,30) y el negativo (LR-) fue de 0,17 (IC 95%: 0,10-0,30), con un valor predictivo negativo del 91,1%. Nuestro estudio mostró una probabilidad pretest de diagnóstico de sepsis (prevalencia de sepsis) del 46,4%. Con dicha prevalencia, se obtuvo que un valor normal de MDW, inferior o igual a 21,5, se asoció a un riesgo bajo de sepsis del 10%, mientras que un resultado anormal del MDW superior a 21,5, aumentaba la probabilidad de tener sepsis hasta un 70%.

Según el análisis longitudinal, el MDW ajustado por edad, sexo y puntuación SOFA se asoció con la mortalidad hospitalaria relacionada con la sepsis [OR: 1,06 (IC 95%: 1,04 - 1,09);  $p < 0,01$ ]. Sin embargo, según el análisis ROC, el MDW no demostró capacidad para identificar la mortalidad hospitalaria relacionada con la sepsis en el momento del ingreso, con un AUC de 0,588 (IC 95%: 0,461-0,714). El valor de corte de MDW más preciso calculado mediante el índice de Youden al ingreso fue 27,20, mostrando una sensibilidad del 81,2% (IC 95%: 59,7-94,8) y una especificidad del 46,2% (IC 95%: 35,6-56,9). El valor de MDW al tercer día mostró una clara tendencia a identificar a los pacientes sépticos con baja probabilidad de muerte AUC [0,643 (IC 95%: 0,523-0,763)]. El valor de corte del MDW calculado mediante el índice de Youden al tercer día fue inferior a 25,1 demostró una sensibilidad del 83,3% (IC 95%: 58,6-96,4) y una especificidad del 48,3% (IC 95%: 37,4-59,3) para identificar a los pacientes que sobrevivirán.

La monitorización de los valores medios de MDW se pueden consultar en la Figura 30, observando dos tendencias bien diferenciadas. En los pacientes sépticos el valor del MDW disminuye, indicando una buena evolución global de estos pacientes durante su ingreso en UCI (Figura 30 A, línea naranja), a pesar de no llegar a valores medios inferiores a 21,5. Por otro lado, los pacientes no sépticos que ingresan en UCI mantienen valores invariables en el paso de los días (Figura 30 A, línea verde). Analizando en detalle el grupo de pacientes no sépticos y desglosándolo en dos; aquellos pacientes que se infectan durante el ingreso (Figura 30 B, línea roja), de los que permanecen sin infección (Figura 30 B, línea verde), se observó que aquellos pacientes que no se infectan durante su ingreso mostraron un resultado de MDW inferior a 21,5 de manera mantenida (Figura 30 B, línea naranja), pudiendo ser un buen valor indicador de detección precoz para sepsis oculta.



**Figura 30. A) Seguimiento del MDW pacientes sépticos (línea naranja) y no sépticos (línea verde) durante el ingreso en UCI. B) Monitorización del MDW en pacientes que se infectan durante su estancia en UCI (línea amarilla).**

### **5.3.3. Estudio 3.3. Eficacia del MDW como biomarcador de cribado en la identificación de pacientes con COVID19 que acuden a urgencias.**

Las características clínicas y los resultados de los biomarcadores para los dos grupos analizados se muestran en la Tabla 17. Pacientes COVID19 positivos mostraron un valor de MDW de 26,0 (23,2-28-6), significativamente superior que en los pacientes COVID19 negativo que fue de 20,6 (18,5-22,8) ( $p<0,001$ ) (Figura 31).

El MDW mostró un rendimiento diagnóstico significativo con una AUC de 0,782 (IC95: 0,739-0,824) para la identificación de pacientes con COVID19. El punto de corte de 21,5 (valor de MDW validado para la identificación de sepsis en urgencias) mostró una sensibilidad de 87%, especificidad de 57%, VPP de 72% y un VPN de 78%. Estos resultados se obtuvieron teniendo en cuenta la elevada prevalencia del 66% (basada en el número total de casos positivos y negativos durante el periodo de estudio, 348/523) para COVID 19 en el momento álgido de la pandemia. Estimaciones en brotes posteriores de COVID19 con prevalencias cercanas al 15% aumentan el VPN hasta un 96%.

Respecto a la estratificación de la gravedad de la COVID19, en la Figura 32 se observa como el MDW aumenta con la gravedad de la enfermedad. En comparación con un MDW normal, un MDW patológico  $> 21,5$  aumenta las probabilidades de que los pacientes con COVID19 estén gravemente enfermos, con una odds ratio de 5,4 (1,9-15,5) para la estratificación grave y de hasta de 10,4 (2,5-44,1) para la crítica. Estos resultados sugieren que el MDW es un buen biomarcador para identificar la gravedad de pacientes con COVID19.

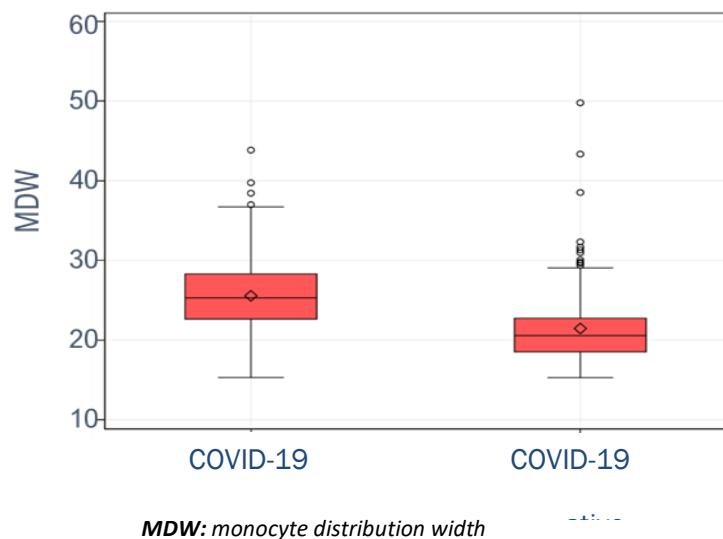
En relación a la estancia hospitalaria, valores elevados de MDW se asociaron a una mayor duración del ingreso hospitalario, como se muestran en la curva de Kaplan-Meier de la Figura 33. La media de días de hospitalización para un MDW normal respecto un MDW patológico  $> 21,5$ , fue de 6 días frente a 17 días, respectivamente ( $p< 0,001$ ).

**Tabla 17. Características demográficas, clínicas y analíticas de los pacientes incluidos en el estudio.**

Sexo y Edad	COVID-19 Negativo (N=175)	COVID-19 Positivo (N=348)	Total 523	P
<b>Mujer (No. %)</b>	90 (51,4%)	148 (42,5%)	238 (45,5%)	
<b>Hombre (No. %)</b>	85 (48,6%)	200 (57,5%)	285 (54,5%)	
<b>Edad, años (Mediana, IQ)</b>	61,0 (45,5-76,0)	59,0 (48,0-72,0)	59,0 (47,0-73,5)	
<b>Severidad (No. %)</b>				
Leve		201 (57,8%)		
Grave		73 (21,0%)		
Crítica		74 (21,3%)		
<b>Síntomas en urgencias (No. %)</b>				
<b>Fiebre</b>	63 (36,0%)	285 (81,9%)	348 (66,5%)	
<b>Tos</b>	75 (42,9%)	231 (66,4%)	306 (58,5%)	
<b>Mucosidad</b>	22 (12,6%)	39 (11,2%)	61 (11,7%)	
<b>Fatiga</b>	45 (25,7%)	116 (33,3%)	161 (30,8%)	
<b>Disnea</b>	84 (48,0%)	179 (51,4%)	263 (50,3%)	
<b>Diarrea</b>	26 (14,9%)	85 (24,4%)	111 (21,2%)	
<b>Otros</b>	79 (45,1%)	143 (41,1%)	222 (42,4%)	
<b>Respiratory Treatment (No. %)</b>				
Cánula de alto flujo		36 (10,3%)		
Ventilación mecánica no invasiva		44 (12,6%)		
Ventilación mecánica invasiva		24 (6,9%)		
<b>Radiografía (No. %)</b>				
<b>Condensación pulmonar</b>	25 (14,3%)	59 (17,0%)	84 (16,1%)	
<b>Infiltración Bilateral Pulmonar</b>	17 (9,71%)	239 (68,7%)	256 (48,9%)	
<b>Biomarcadores (Median, IQR)</b>				
<b>IL-6 (pg/ml)</b>	8,8 (3,2-50,8)	30,2 (12,8-75,7)	24,0 (6,3-70,5)	*p<0,001
<b>Dímero-D (ng/ml)</b>	510,0 (280,0-1662,0)	634,5 (365,8-1115,0)	577,0 (332,0-1158,0)	p=0,305
<b>MDW</b>	20,6 (18,5-22,7)	25,5 (22,8-28,3)	24,1 (20,6-27,6)	*p<0,001
<b>LEU (x10<sup>3</sup>/μL)</b>	9,1 (7,1-11,8)	6,6 (5,1-8,8)	7,3 (5,7-9,8)	*p<0,001
<b>PCT (ng/ml)</b>	0,05 (0,02-0,13)	0,09 (0,04-0,24)	0,07 (0,03-0,20)	*p<0,001
<b>PCR(mg/L)</b>	11,6 (2,5-60,1)	67,0 (16,7-132,1)	47,0 (8,1-115,4)	*p<0,001
<b>Disposición de los pacientes</b>				
<b>Estancia hospitalaria (Mediana, IQ)</b>	7,5 (4,0-13,0)	10,0 (5,0-17,5)	9,0 (5,0-16,0)	
<b>Estancia en UCI (Mediana, IQ)</b>	3,0 (3,0-3,0)	12,5 (8,0-38,3)	12,0 (7,5-37,5)	
<b>Mortalidad (No. %)</b>	13 (7,42%)	47 (13,5%)	60 (11,5%)	

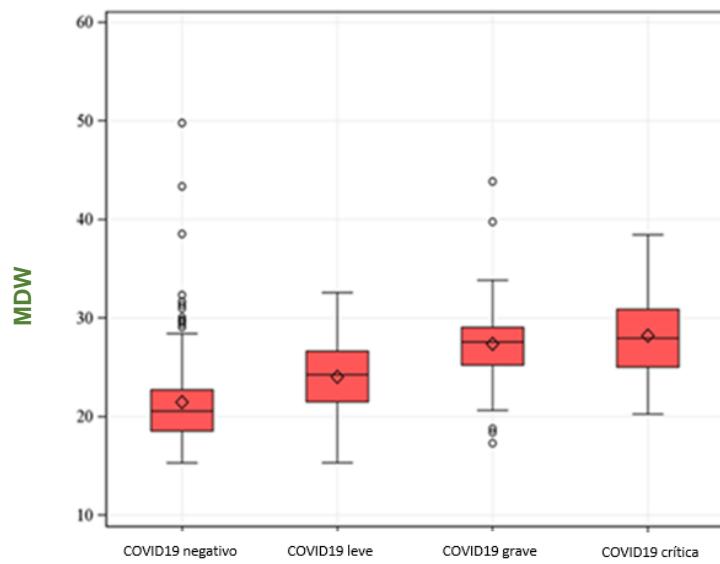
**IL-6:** interleucina 6. **MDW:** monocyte distribution width. **LEU:** recuento de leucocitos. **PCT:** procalcitonina.

**PCR:** proteína C reactiva.



*MDW: monocyte distribution width*

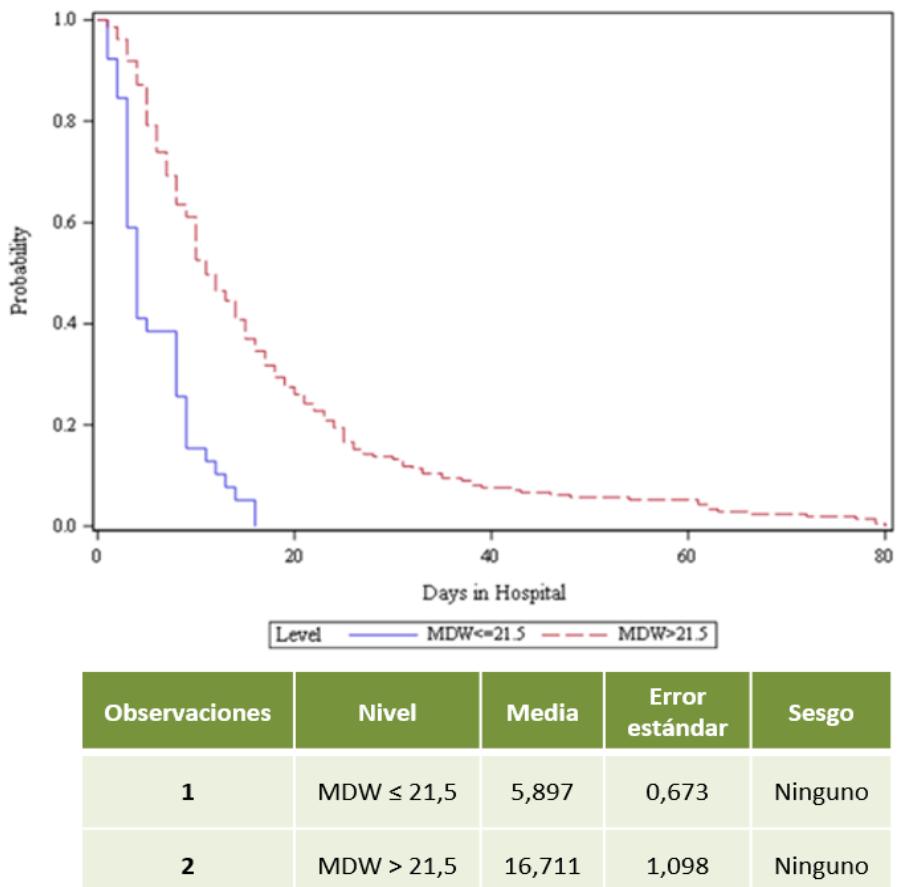
**Figura 31: Diagrama de cajas para el MDW entre los pacientes COVID-19 positivos y COVID-19 negativos.**



MDW	Mediana (IC)	N
COVID19 negativo	20,6 (18,5-22,8)	175
COVID19 leve	24,3 (21,4-26,6)	201
COVID19 grave	27,6 (25,2-29,1)	73
COVID19 crítica	27,9 (25,0-30,9)	74

*MDW: monocyte distribution width*

**Figura 32: Diagrama de cajas para el MDW según el nivel de gravedad de la COVID-19.**



*MDW: monocyte distribution width*

**Figura 33: Curvas de Kaplan Mier del MDW para la estancia hospitalaria en pacientes con COVID19.**

## 6. DISCUSIÓN

El hemograma es una de las pruebas de laboratorio solicitadas con mayor frecuencia por parte de los clínicos; es fácilmente realizable y altamente rentable, aportando una información valiosa en la orientación diagnóstica de diversas enfermedades, tanto hematológicas como no hematológicas. Su determinación incluye el análisis cuantitativo y cualitativo en sangre periférica de las tres series hematopoyéticas: eritrocitaria, leucocitaria y plaquetaria.

En la actualidad los analizadores hematimétricos combinan varias metodologías analíticas junto a algoritmos complejos con el fin de proporcionar la máxima información celular posible de manera exacta y reproducible. Además, las tecnologías disponibles en los analizadores de hematología permiten disponer de nuevas magnitudes celulares, denominadas "*Cell Population Data*" (CPD), que reflejan de manera específica y cuantitativa características morfológicas de determinadas poblaciones celulares, como los eritrocitos, reticulocitos, neutrófilos, linfocitos o monocitos.

En la actualidad, a pesar del potencial clínico que pueden mostrar, la mayoría de los CPDs proporcionados por los analizadores hematológicos son magnitudes consideradas RUO (*for research use only*) o de investigación, no pudiendo ser, de momento, reportables en el informe analítico. Es por ello necesario realizar evaluaciones analíticas completas y estudios clínicos que validen el uso de los CPDs en la práctica clínica.

Los resultados obtenidos en los diferentes trabajos que componen la presente tesis doctoral demuestran la utilidad clínica de los CPDs en diferentes escenarios. Su incorporación en la práctica asistencial permitiría detectar cambios morfológicos en las células sanguíneas en respuesta a diferentes procesos clínicos, mejorando la detección precoz de determinadas enfermedades.

Los **CPDs de serie roja** obtenidos en el hemograma, constituidos por los **CPDs de la población de eritrocitos (NonRET) y de reticulocitos (RET)**, pueden cuantificar las características morfométricas de ambas poblaciones celulares y discriminar de manera rápida y sencilla entre BT y AF. Los CPDs analizados en el estudio muestran de manera individual un buen rendimiento diagnóstico entre AF y BT. Este rendimiento se incrementa cuando combinamos varias magnitudes clásicas del hemograma con los CPD

estudiados, potenciando el poder discriminatorio entre las dos entidades. Con este propósito se obtuvo la **fórmula CMI**, que pretende potenciar las diferencias celulares entre AF y BT, mejorando así la precisión diagnóstica. La fórmula CMI consiguió el mejor rendimiento con una AUC de 0,98. Dicha fórmula CMI se obtuvo teniendo en cuenta los resultados individuales de los CPDs y las siguientes consideraciones:

- En el numerador de la fórmula se incluyen las magnitudes que presentan un mayor valor en las BT respecto a las AF, como son: el **recuento de RBC** y la conductividad de la población RET (**MN-C-RET** y **SD-C-RET**).
- En el denominador se incluyen aquellas magnitudes que, de manera significativa, presentan un menor valor en las BT que en las AF. Estas magnitudes son **MN-V-NonRET**, **ADE-SD** y **VCM**.

El estudio realizado ha demostrado los buenos resultados obtenidos en la fórmula CMI mediante, primero, la comparación con otras fórmulas e índices publicados en la literatura científica y, segundo, validando la fórmula CMI en una cohorte prospectiva. Al aplicar las diferentes fórmulas descritas (49-56) en nuestra población, se obtienen algunas AUC con rendimientos cercanos al 95%, pero ninguna supera el conseguido por la fórmula CMI. Nuestra fórmula es la que presentó un mayor rendimiento diagnóstico, del 98% con un índice de Youden de 0,89. La fórmula CMI, única descrita hasta el momento que combina CPDs de eritrocitos y reticulocitos, junto a magnitudes del hemograma, consigue la mayor sensibilidad entre todas las fórmulas comparadas en una cohorte amplia de pacientes (cerca de 500), con una muy alta especificidad, reduciendo así la presencia de falsos positivos y consecuentemente, la realización de pruebas complementarias innecesarias. En la cohorte de validación, los buenos resultados de sensibilidad y especificidad se mantuvieron, obteniendo únicamente una tasa de falsos positivos del 7,5%.

A pesar de los buenos resultados obtenidos, el primer trabajo presenta algunas limitaciones que cabe mencionar. Nuestra fórmula CMI está validada sólo para pacientes adultos mayores de 18 años. A pesar de que durante la realización del estudio se ha comprobado la fórmula de manera esporádica en algunos pacientes pediátricos, obteniendo buenos resultados y clasificando correctamente aquellos pacientes con BT,

sería necesario reproducir los resultados del trabajo en una mayor cohorte de pacientes menores de 18 años. Así mismo, en este trabajo no se han incluido pacientes con  $\alpha$ -talasemia debido a que la expresión analítica de la  $\alpha$ -talasemia es muy variable pudiendo enmascarar los resultados obtenidos. A menudo, las  $\alpha$ -talasemias cursan con muy discreta microcitosis y sin poliglobulía, e incluso en ocasiones pueden cursar con ausencia de microcitosis pudiendo mostrar un hemograma sin alteraciones significativas (56). Al igual que en la gran mayoría de trabajos publicados en la literatura científica, es de suponer que la fórmula CMI obtenida en este trabajo discrimine mejor los pacientes con diagnóstico de BT que con  $\alpha$ -talasemia (56-58). Respecto a los pacientes con BT que cursan con ferropenia, las fórmulas discriminantes publicadas en la literatura clasifican a estos pacientes como AF. Esta clasificación inicial no es del todo errónea, siendo necesario el tratamiento con hierro para corregir el déficit. Es lo ocurrido en 2 de los 3 pacientes clasificados como AF en la cohorte de validación. Los dos pacientes tenían un diagnóstico previo de BT y en el momento del estudio presentaban ferropenia. A pesar que la fórmula CMI discrimina correctamente estos pacientes, sería necesario analizar con más detalle los pacientes con BT y ferropenia, ya que no se trata de un fenómeno inusual (17, 18).

La implementación de la fórmula CMI en el flujo de trabajo de rutina optimizaría los procedimientos y mejoraría el diagnóstico de BT y AF. Su implementación requeriría la transmisión online de los resultados de los CPDs y la ejecución de la fórmula en el sistema Middleware de los analizadores, o bien directamente en el sistema informático del laboratorio. En la Figura 35 se propone un flujo de trabajo sobre el diagnóstico diferencial de las microcitosis una vez implementada la fórmula. La aplicación de la **fórmula CMI** en la rutina diaria mejoraría los procedimientos de trabajo, automatizando y optimizando la ampliación de aquellas pruebas analíticas adicionales, como las relacionadas con el metabolismo del hierro o el estudio de hemoglobinopatías, necesarias para el diagnóstico definitivo de las dos entidades.

## Microcitosis

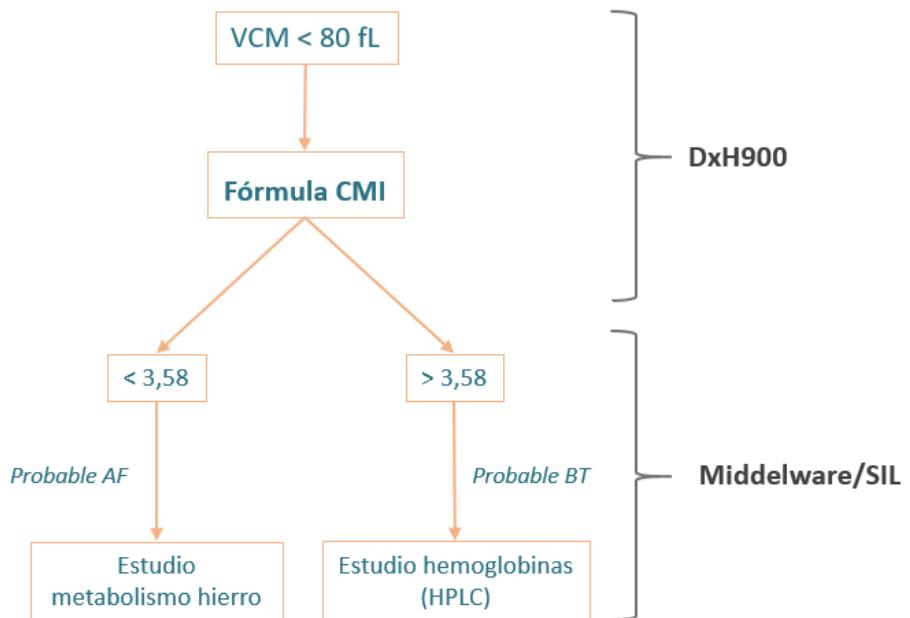


Figura 35. Diagnóstico diferencial de las microcitosis. Flujo de trabajo propuesto con la incorporación de la fórmula CMI.

En resumen, la fórmula CMI constituiría una buena herramienta en el cribado inicial entre BT y AF, mejorando el rendimiento diagnóstico de las fórmulas publicadas hasta el momento y permitiendo ampliar aquellas pruebas complementarias necesarias para el diagnóstico definitivo y tratamiento adecuado de las dos entidades. Además, la aplicación de la fórmula no requiere ningún coste añadido obteniéndose automáticamente de manera rápida y sencilla en la realización del hemograma.

Por otro lado, la hematimetría también juega un papel clave en la detección y diagnóstico de la gran mayoría de hemopatías con expresión periférica. La sospecha inicial de los **síndromes mielodisplásicos (SMD)** se basa, primero, en la aparición de **citopenias** en sangre periférica, donde el hemograma tiene un papel fundamental, y posteriormente en la detección de **displasia morfológica** en la revisión del frotis de sangre periférica. Mientras que el hemograma ofrece rápidamente unos resultados cuantitativos precisos y reproducibles, la revisión citológica para la detección de displasia no está exenta de ciertas limitaciones; requiere tiempo para su realización, experiencia por parte del observador y muestra una elevada subjetividad entre observadores. La incorporación en

el proceso asistencial de nuevas magnitudes morfométricas cuantitativas, como los CPDs, rentabilizaría el uso del frotis de sangre periférica, mejorando la detección precoz de pacientes con SMD. Los resultados obtenidos en los 3 estudios desarrollados, y que forman parte del trabajo 2, demuestran que los **CPDs de la población de neutrófilos** son magnitudes morfométricas que reflejan de manera precisa y fiable la presencia de displasia en la población de neutrófilos, constituyendo una buena herramienta para identificar la presencia de un SMD.

El estudio 2.1 demuestra qué características morfológicas como el tamaño, la estructura nuclear y la complejidad de los neutrófilos en pacientes con SMD pueden ser valoradas mediante el análisis cuantitativo de los CPDs y diferenciarlos así, de la población normal. Dichos neutrófilos se caracterizan por presentar un menor tamaño celular, cuya cuantificación está representada por el CPD de Volumen, mostrando un menor volumen celular medio (**MN-V-NE**) respecto a neutrófilos de pacientes sin SMD. Otra característica citológica que pueden mostrar los neutrófilos en los SMD es la hipercondensación de la cromatina del núcleo (26). La presencia de esta característica morfológica produce una disminución en la conductividad de los neutrófilos, mostrando una menor **C** respecto a la de una población de neutrófilos sin displasia. Mediante la **C** obtenida por la tecnología VCSn, se analiza la estructura interna celular, proporcionando información tanto de la relación núcleo/citoplasma como de la estructura del núcleo y su cromatina. De este modo, valores disminuidos de **MN-C-NE** y **SD-C-NE** identifican cambios en la condensación y estructura del núcleo en neutrófilos de pacientes con SMD. A su vez, el grado de segmentación del núcleo y de la granulación citoplasmática, características que representan la complejidad celular en los neutrófilos, también puede ser cuantificada de manera precisa mediante la dispersión láser (**Sn**) en el analizador DxH, tal y como se demuestra en los resultados obtenidos en los 3 estudios realizados. Los ángulos de dispersión medio (**SM**), alto (**SU**) y bajo (**SL**) muestran una disminución de la MN junto a un aumento de la SD, indicando en conjunto una menor complejidad celular. La disminución de la **MN** posicional se explica por la presencia de neutrófilos hipogranulados e hiposegmentados que dan lugar a una menor dispersión media, respecto a una población sin neutrófilos displásicos. Respecto al aumento en la **SD** en la

población con SMD, se debe a la variación de la proporción entre neutrófilos displásicos y no displásicos en las muestras, ya que coexisten ambos. La presencia de neutrófilos displásicos incrementa la variabilidad de la población de neutrófilos y su porcentaje dependerá tanto del tipo como del estadio del SMD. En cambio, en una población normal, sin displasia, no existe esta variación displásica ya que todos los neutrófilos son normales, obteniendo unas SD más bajas. De este modo, los CPDs de dispersión laser reflejan la presencia de displasia granulocítica siendo buenos biomarcadores para diferenciar pacientes con SMD de población sin estas alteraciones.

Inicialmente, la sospecha diagnóstica de los SMD se basa en la aparición de una citopenia en sangre periférica, que junto con otros valores del hemograma condiciona la revisión del frotis de sangre periférica para poder detectar la presencia o no de displasia. Determinadas enfermedades que cursan con citopenias crónicas, como la ERC o la HPT, pueden dificultar la detección de un SMD. Los resultados obtenidos en el estudio 2.2 demuestran que los CPDs de la población de neutrófilos son útiles en la distinción entre un SMD y otras citopenias no clonales, en especial los ángulos medios, **MN-SM-NE**, **MN-SU-NE** y **MS-SU-NE**. Las combinaciones evaluadas en el estudio 2.2 han permitido mejorar el rendimiento diagnóstico hasta conseguir, a partir del **Índice SMD**, una AUC de 0,911. El **Índice SMD** combina los ángulos de dispersión **MN-SU-NE** y **MN-SL-NE** con el porcentaje de neutrófilos presente, corrigiendo así la posible variabilidad morfológica. Esta fórmula se definió teniendo en cuenta aquellos ángulos que mejor representaban la presencia de displasia y ajustándolos por el recuento de neutrófilos en porcentaje al tratarse de pacientes con citopenias. Un punto de corte de 110 en el **Índice SMD** muestra una sensibilidad de 90,8% y una especificidad de 78,3% para la detección de SMD respecto a otras citopenias secundarias.

Finalmente, los resultados obtenidos en el estudio 2.3 corroboran que los CPDs pueden constituir una herramienta objetiva en la detección de displasia, mejorando la elevada variabilidad y subjetividad que presenta la observación al frotis de sangre periférica. En este caso, respecto a las alteraciones displásicas en los neutrófilos, los CPDs de dispersión láser correlacionan mejor con la presencia de hipogramulación del citoplasma, que de hiposegmentación del núcleo. Los resultados del estudio 2.3 demuestran que el grado

de hiposegmentación e hipogranulación correlacionan negativamente y de manera significativa con los CPD de dispersión. Eso significa que, a mayor número de neutrófilos displásicos, menor valor muestran los CPDs de dispersión, tales como el **MN-SM-NE** o **MN-SU-NE**.

En resumen, el uso de los **CPDs de la población de neutrófilos** nos permite diferenciar a pacientes con displasia de población normal, así como de otras citopenias no clonales, constituyendo una buena herramienta objetiva y reproducible para el diagnóstico precoz de pacientes con SMD.

A pesar de los avances terapéuticos de la medicina, la sepsis continúa siendo un problema sanitario de gran envergadura, no solo por la morbilidad y mortalidad que se asocian con ella; sino también, por el consumo de recursos que conlleva (35). Cada retraso en la identificación de la sepsis supone un incremento exponencial en la morbimortalidad para el paciente. Por lo contrario, las intervenciones que puedan permitir un diagnóstico más temprano y una mayor alerta en aquellos enfermos potencialmente graves garantizarán planes terapéuticos que serán de gran ayuda para disminuir dicha morbimortalidad (37, 60). En la actualidad no existe un *gold standard* para la identificación de la sepsis y su diagnóstico se basa en la valoración de escalas clínicas en ocasiones complejas. Es por ello que se hace necesaria la búsqueda de biomarcadores que reflejen el proceso fisiopatológico de la sepsis con el objetivo de conseguir una identificación lo más rápida posible y con ello un mejor manejo clínico del paciente (32).

Los resultados obtenidos en los tres estudios llevados a cabo y que forman parte del trabajo 3, demuestran que el **MDW**, un **CPD de la población de monocitos** y que representa la **DS-V-MO**, es un buen indicador precoz para el diagnóstico de sepsis, pudiendo constituir una herramienta fundamental en el abordaje de una enfermedad con un gran impacto clínico. Además, el MDW permite identificar aquellos pacientes con infección por SARS-CoV-2, teniendo también un papel clave en el desarrollo de otra enfermedad infecciosa importante como es la COVID19.

Los monocitos son células del sistema inmune innato que participan, junto a los neutrófilos, como segunda línea de defensa. Son capaces de detectar la presencia de patógenos en nuestro organismo e instruir al sistema inmune adaptativo para su control y eliminación (61). Los monocitos juegan un papel importante en la aparición y desarrollo de la sepsis, participando en dos procesos clave de su patogenia: en una fase hiperinflamatoria con secreción excesiva de citoquinas y mediadores proinflamatorios y en otra fase de inmunosupresión con secreción de citoquinas antiinflamatorias. En el curso de la sepsis, los monocitos en sangre periférica sufren una polarización entre su estado hiperinflamatorio y el de inmunosupresión, alterando su funcionalidad y estructura celular (62, 63). La heterogeneidad de las subpoblaciones de monocitos en sangre periférica permanece estable en condiciones fisiológicas normales, pero se ve incrementada en respuesta a diversos procesos infecciosos como la sepsis o la COVID19. Estos procesos conllevan cambios funcionales y conformacionales de los monocitos, produciendo su estimulación celular, secreción de citoquinas pro y antiinflamatorias e incremento del tamaño celular, siendo la base para la determinación celular del MDW.

Al tratarse de un CPD de la población de monocitos, el MDW se obtiene automáticamente en la medición del hemograma, proporcionando unos resultados cuantitativos precisos de manera rápida y fiable. A diferencia de otros CPDs, el **MDW** dispone de dos controles de calidad, el control COULTER LATRON CP-X látex para el seguimiento de la tecnología VCSn y el control valorado COULTER 6C Plus Cell que valora cuantitativamente las magnitudes que componen el hemograma, incluyendo tanto la concentración de monocitos como el MDW, permitiendo así la detección de posibles desviaciones y conseguir así un adecuado seguimiento analítico.

El primer estudio realizado en una cohorte de pacientes europeos que acuden al servicio de urgencias confirma la validez clínica y precisión diagnóstica del **MDW** para la identificación temprana de sepsis, obteniendo un punto de corte óptimo para el tubo EDTAK3 de 21,5. Este punto muestra una diferencia de 1,5 puntos respecto al EDTAK2 que es de 20,0 (45, 46). Un valor de **MDW** superior a 21,5 puede alertar de una sepsis potencial, incluso en pacientes que inicialmente no presenten sospecha clínica. La obtención del MDW en pacientes que llegan a los servicios de urgencias, añadiría valor

a las escalas de criterios clínicos más utilizadas, como SIRS o qSOFA, en el diagnóstico de sepsis. Los buenos resultados obtenidos en el estudio han colaborado a que el MDW consiga ampliar la marca CE como indicador precoz de sepsis en pacientes que acuden a urgencias en tubos EDTAK3, ya estando disponible previamente en EDTAK2.

Por otra parte, el estudio realizado en la UCI confirma que el **MDW** también es un buen biomarcador para la detección de sepsis en estos pacientes. Además de constituir una herramienta para el diagnóstico al ingreso en UCI, el MDW ha demostrado ser un buen indicador para detectar aquellos pacientes que se infectan durante su estancia en UCI. Las guías actuales sobre el manejo de la sepsis y shock séptico, no recomiendan el uso de ningún biomarcador analítico para el pronóstico y seguimiento de pacientes con sepsis (42). Es por ello importante los resultados obtenidos en la UCI. Un valor de MDW superior a 21,5 es útil para detectar una sepsis antes de sus manifestaciones clínicas. La monitorización analítica mediante el MDW sería una estrategia viable y ágil para el seguimiento de pacientes ingresado en UCI, pudiéndose realizar diariamente.

Tanto el estudio realizado en urgencias como en la UCI confirman que el MDW muestra un rendimiento comparable a la PCR y superior a la PCT. A diferencia de la PCR o PCT, el MDW no necesita una centrifugación previa con el retraso de tiempo que puede suponer, ya que como se ha comentado anteriormente, se obtiene rápidamente y de forma automática en la medición del hemograma. Además, el MDW presenta la ventaja frente otros biomarcadores que sus valores aumentan independientemente del tipo de microorganismo causante. De esta forma, a diferencia de la PCT y PCR, podemos encontrar aumentos del MDW tanto en infecciones bacterianas como víricas o fúngicas (64).

En los diferentes estudios se ha comprobado con el MDW aumenta a medida que incrementa la gravedad de los pacientes, tanto sépticos como con COVID19. Este hecho indica que el MDW es un buen biomarcador para predecir la gravedad de los pacientes, pudiendo identificarlos y actuar rápidamente sobre ellos. Un valor superior a 21,5 incrementa significativamente la probabilidad de presentar una mayor gravedad de sepsis y de COVID19. Además, valores superiores a 21,5 de MDW están relacionados con una mayor estancia hospitalaria.

Es necesario comentar que existen determinadas enfermedades que afectan a las poblaciones celulares, principalmente enfermedades hematológicas e inmunológicas que interfieren en la medición del MDW. Por otro lado, en el caso que exista una población disminuida de monocitos en sangre periférica ( $< 0.1 \times 10^9/L$ ) el analizador no puede obtener un resultado fiable de MDW ya que no se puede integrar de manera precisa, emitiendo un error de medición. También es importante destacar que hasta el momento se desconoce el papel que puede jugar el MDW en la población pediátrica, pero con los buenos resultados obtenidos en adultos, podría ser un biomarcador prometedor en este tipo de pacientes.

En resumen, la consideración de un nuevo **biomarcador celular** relacionado con la **población de los monocitos**, como es el **MDW**, en los algoritmos diagnósticos mejoraría la detección precoz de pacientes con sepsis, así como con COVID19, ayudando a los clínicos a evaluar la gravedad y el pronóstico de la enfermedad en estos pacientes.

## **7. CONCLUSIONES**

En la presente tesis doctoral, los resultados obtenidos en los diferentes estudios realizados y que constituyen los 3 trabajos desarrollados, dan respuesta a la hipótesis general de la tesis, concluyendo que los CPDs de diferentes poblaciones celulares, obtenidos en el hemograma, son magnitudes morfométricas que contribuyen a mejorar el diagnóstico precoz y pronóstico de distintas enfermedades, tanto hematológicas como no hematológicas.

A continuación, se enumeran las principales conclusiones derivadas de los estudios que componen la tesis doctoral:

1. Los **CDPs** en las poblaciones de **eritrocitos** y **reticulocitos** permiten diferenciar entre las dos principales causas de microcitosis, la AF y la BT. La generación de la fórmula **CMI**, integrada mediante la combinación de magnitudes clásicas del hemograma y los **CPDs** de serie roja, incrementa el poder discriminatorio entre las dos entidades, obteniéndose automáticamente de manera rápida y sencilla en la realización del hemograma sin ningún coste añadido. La implementación de la fórmula **CMI** en los procedimientos de rutina constituiría una buena herramienta en el cribado inicial entre BT y AF, mejorando el rendimiento diagnóstico y optimizando los flujos de trabajo, permitiendo ampliar aquellas pruebas complementarias necesarias para el diagnóstico definitivo y tratamiento adecuado de las dos entidades.
2. Los **CDPs** de la población de **neutrófilos** permiten identificar cambios morfológicos en el tamaño, la estructura nuclear y la complejidad celular, detectando cuantitativamente la presencia de displasia granulocítica en sangre periférica. De este modo, el uso de los **CPDs de neutrófilos** permite diferenciar a pacientes con **SMD** de población normal, así como de otras citopenias no clonales mediante el **Índice SMD**, constituyendo una buena herramienta objetiva y reproducible para el diagnóstico precoz de pacientes con **SMD**.
3. El **MDW** es un buen biomarcador precoz para el diagnóstico de **sepsis** tanto en pacientes que acuden a **urgencias** como en ingresados en **UCI**, incluso en pacientes con baja sospecha clínica, mostrando un elevado rendimiento diagnóstico

adelantándose así a la aparición de las manifestaciones clínicas. Además, permite la detección de pacientes infectados con SARS-CoV-2 en urgencias. Así mismo, niveles elevados de **MDW** se correlacionan con la gravedad y el pronóstico de la enfermedad en pacientes con sepsis, así como en pacientes con COVID19. Su determinación se realiza de manera rápida mediante la realización del hemograma, obteniendo unos resultados en pocos minutos, a diferencia de otros biomarcadores determinados en suero. Por tanto, su implementación en los procedimientos de trabajo, tanto clínicos como de laboratorio, incrementaría la detección precoz, ayudando a los clínicos a evaluar rápidamente la gravedad de la enfermedad, mejorando el pronóstico de la en estos pacientes.

## **8. LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS**

De la presente tesis doctoral, se derivan las siguientes líneas de investigación futuras:

- ✓ Estudiar la **variabilidad biológica** que pueden presentar los diferentes **CPDs**. La obtención de resultados de variación biológica de CPDs podrían ayudar a establecer unas especificaciones de calidad analítica adecuadas para estas magnitudes y poder estudiar el valor de referencia del cambio, para contribuir a una mejora diagnóstica.
- ✓ Evaluar los **CPDs** de la población de **eritrocitos** y **reticulocitos** en el diagnóstico diferencial de las **anemias hemolíticas**. Este estudio mejoraría la detección de esferocitos en sangre periférica y podría contribuir a la detección de esferocitosis hereditaria frente a otros tipos de anemias hemolíticas.
- ✓ Analizar la utilidad de los **CPDs** en el diagnóstico de **anemias carenciales** por déficit de **vitamina B12** y/o **folato**. Resultados preliminares de CPDs en las poblaciones de neutrófilos y monocitos podrían mejorar el diagnóstico diferencial de las anemias macrocíticas.
- ✓ Analizar el papel de los **CPDs** de la población de **linfocitos** en el diagnóstico diferencial de las **linfocitosis**, pudiendo identificar precozmente aquellas linfocitosis de origen clonal (hematológicas) de las linfocitosis víricas.
- ✓ Evaluar la utilidad clínica del **MDW** en el diagnóstico y pronóstico de sepsis en la **población pediátrica**.
- ✓ Estudiar los valores de los **CPDs** de la población de **monocitos** en pacientes con diagnóstico de **leucemia mielomonocítica crónica**, con el objetivo de adelantar su identificación y contribuir al diagnóstico diferencial de las monocitosis.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Horton S, Fleming KA, Kuti M, Looi LM, Pai SA, Sayed S, Wilson ML. The Top 25 Laboratory Tests by Volume and Revenue in Five Different Countries. *Am J Clin Pathol.* 2019 Apr 2;151(5):446-451.
2. Simson E. Wallace Coulter's life and his impact on the world. *Int J Lab Hematol.* 2013 Jun;35(3):230-6.
3. Buttarello M, Plebani M. Automated blood cell counts: state of the art. *Am J Clin Pathol.* 2008 Jul;130(1):104-16.
4. Green R, Wachsmann-Hogiu S. Development, history, and future of automated cell counters. *Clin Lab Med.* 2015 Mar;35(1):1-10. doi: 10.1016/j.cll.2014.11.003. Epub 2015 Jan 5. PMID: 25676368.
5. Instructions for use. UniCel DxH 900 Coulter Cellular Analysis System and UniCel DxH Slidemaker Stainer II Coulter Cellular Analysis System. Nyon, Switzerland: Beckman Coulter Eurocenter SA; 2017.
6. Martinez-Iribarren A, Tejedor X, Sala Sanjaume À, Leis A, Doladé Botias M, Morales-Indian C. Performance evaluation of the new hematology analyzer UniCel DxH 900. *Int J Lab Hematol.* 2021 Aug;43(4):623-631.
7. World Health Organization. Assessing the Iron Status of Populations: Report of a joint World Health Organization/Centers for Disease Control and Prevention Technical Consultation on the Assessment of Iron Status at the Population Level. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.
8. Camaschella C. Iron-deficiency anemia. *N Engl J Med.* 2015 May 7;372(19):1832-43.
9. Shine I, Lal S. A strategy to detect beta-thalassemia minor. *Lancet.* 1977;1:692-694.
10. Rund D, Rachmilewitz E.  $\beta$ -thalassemia. *N Engl J Med.* 2005;353:1135-1146.
11. Morales-Indian C. Diagnóstico diferencial de las hemoglobinopatías. Ed Cont Lab Clín; 28: 53-71 2016-2017.
12. Hallberg L. Iron requirements: comments on methods and some crucial concepts in iron nutrition. *Biol Trace Elem Res.* 1992;35:25-45.
13. Wintrobe MM. Classification of the Anemias on the Basis of Differences in the Size and Hemoglobin Content of the Red Corpuscles. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* 1930;27(9):1071-1073.
14. Wintrobe MM. The direct calculation of the volume and hemoglobin content of the erythrocyte. *Am J Clin Path.* 1931;1:147-9.
15. Wintrobe MM. The size and hemoglobin content of the erythrocyte. *J Lab Clin Med.* 1932;17:899-912.

16. Wintrobe MM. Anemia: classification and treatment on basis of differences in the average volume and hemoglobin content of the red corpuscles. *Arch Intern Med (Chic)*. 1934;54(2):256-80.
17. Hoffmann JJ, Urrechaga E, Aguirre U. Discriminant indices for distinguishing thalassemia and iron deficiency in patients with microcytic anemia: a meta-analysis. *Clin Chem Lab Med*. 2015 Nov;53(12):1883-94.
18. Urrechaga E, Hoffmann JJML. Critical appraisal of discriminant formulas for distinguishing thalassemia from iron deficiency in patients with microcytic anemia. *Clin Chem Lab Med*. 2017 Aug 28;55(10):1582-1591.
19. Tefferi A, Vardiman JW. Myelodysplastic syndromes. *N Eng J Med* 2009; 361:1872-1885.
20. M. Cazzola, L. Malcovati, Myelodysplastic syndromes—coping with ineffective hematopoiesis, *N. Engl. J. Med.* 2005; 352 (6): 536-538.
21. García-Manero G. Myelodysplastic syndrome: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 2014; 89:97-108.
22. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Cytopenia levels for aiding establishment of the diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2016;128(16): 2096-2097.
23. Gangat A, Patnaik M and Tefferi A. Myelodysplastic syndromes: a contemporary review and how we treat. *Am J Hematol* 2016; 91:76-89.
24. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. *World Health Organization Classification of Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2008:1-439.
25. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-405.
26. Woessner S, Florensa L. *La citología óptica en el diagnóstico hematológico*. Quinta edición. FEHH. Editorial Acción Médica. Madrid, 2006.
27. Meers S. The myelodysplastic syndromes: the era of understanding. *Eur J Haematol* 2015;94(5):379- 90.
28. Senent L, Arenillas L, Lunño E, et al. Reproducibility of the World Health Organization 2008 criteria for myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2013;98(4): 568-575.
29. Font P, Loscertales J, Benavente C, et al. Interobserver variance with the diagnosis of myelodysplastic syndromes (MDS) following the 2008 WHO classification. *Ann Hematol*. 2013; 92(1): 19-24.

30. P. Font, J. Loscertales, C. Soto, et al. Interobserver variance in myelodysplastic syndromes with less than 5% bone marrow blasts: unilineage vs. multilineage dysplasia and reproducibility of the threshold of 2% blasts, *Ann. Hematol.* 2015;94(4): 565–573.
31. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet.* 2020 Jan 18;395(10219):200-211.
32. Julián-Jiménez A, Gorordo-Delsol LA, Merinos-Sánchez G, et al. The Guadalajara Declaration on sepsis: emergency physicians' constructive comments on the Surviving Sepsis Campaign's 2021 updated guidelines. *Emergencias.* 2023 Feb;35(1):53-64.
33. Liu V, Escobar GJ, Greene JD, Soule J, Whippy A, Angus DC, Iwashyna TJ. Hospital deaths in patients with sepsis from 2 independent cohorts. *JAMA.* 2014 Jul 2;312(1):90-2.
34. Seymour CW, Gesten F, Prescott HC, Friedrich ME, Iwashyna TJ, Phillips GS, Lemeshow S, Osborn T, Terry KM, Levy MM. Time to Treatment and Mortality during Mandated Emergency Care for Sepsis. *N Engl J Med.* 2017 Jun 8;376(23):2235-2244.
35. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, et al. International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock. 2016. *Intensive Care Med.* 2017 Mar; 43:304-377.
36. ProCESS Investigators, Yealy DM, Kellum JA, Huang DT, Barnato AE, Weissfeld LA, et al. A Randomized Trial of Protocol-Based Care for Early Septic Shock. *N Engl J Med* 2014; 370:1683-93.
37. Damiani E, Donati A, Serafini G, et al: Effect of performance improvement programs on compliance with sepsis bundles and mortality: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *PLoS One* 2015; 10:e0125827.
38. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016;315:801-10.
39. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* 2003;29:530-8.
40. Raith EP, Udy AA, Bailey M, McGloughlin S, MacIsaac C, Bellomo R, Pilcher DV; Australian and New Zealand Intensive Care Society (ANZICS) Centre for Outcomes and Resource Evaluation (CORE). Prognostic Accuracy of the SOFA Score, SIRS Criteria, and qSOFA Score for In-Hospital Mortality Among Adults With Suspected Infection Admitted to the Intensive Care Unit. *JAMA.* 2017 Jan 17;317(3):290-300.

41. Serafim R, Gomes JA, Salluh J, Póvoa P. A Comparison of the Quick-SOFA and Systemic Inflammatory Response Syndrome Criteria for the Diagnosis of Sepsis and Prediction of Mortality: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Chest*. 2018 Mar;153(3):646-655.
42. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, Coopersmith CM, French C, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Crit Care Med*. 2021;49:e1063-e1143
43. Faix JD. Biomarkers of sepsis. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2013 Jan-Feb;50(1):23-36. doi: 10.3109/10408363.2013.764490. PMID: 23480440; PMCID: PMC3613962.
44. Pierrakos C, Velissaris D, Bisdorff M, Marshall JC, Vincent JL. Biomarkers of sepsis: time for a reappraisal. *Crit Care*. 2020 Jun 5;24(1):287. doi: 10.1186/s13054-020-02993-5. PMID: 32503670; PMCID: PMC7273821.
45. Crouser ED, Parrillo JE, Seymour C, et al. Improved Early Detection of Sepsis in the ED Width a Novel Monocyte Distribution Width Biomarker. *Chest* 2017; 152: 518-526.
46. Crouser ED, Parrillo JE, Seymour C, et al. Monocyte Distribution Width: A novel indicator of Sepsis-2 and Sepsis-3 in High-Risk Emergency Department Patients\*. *Crit Care Med* 2019; 47 (9):1018-1025.
47. Gautret P, Million M, Jarrot PA, et al. Natural history of COVID-19 and therapeutic options. *Expert Rev Clin Immunol*. 2020 Dec;16(12):1159-1184.
48. Costela-Ruiz VJ, Illescas-Montes R, Puerta-Puerta JM, Ruiz C, Melguizo-Rodríguez L. SARS-CoV-2 infection: The role of cytokines in COVID-19 disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2020 Aug; 54:62-75.
49. Mentzer WC Jr. Differentiation of iron deficiency from thalassaemia trait. *Lancet*. 1973 Apr 21;1 (7808):882.
50. England JM, Fraser PM. Differentiation of iron deficiency from thalassaemia trait by routine blood-count. *Lancet*. 1973 Mar 3;1 (7801):449-52.
51. Shine I, Lal S. A strategy to detect beta-thalassaemia minor. *Lancet*. 1977 Mar 26;1(8013):692-4.
52. Ricerca BM, Storti S, d'Onofrio G, Mancini S, Vittori M, Campisi S, Mango G, Buzzi B. Differentiation of iron deficiency from thalassaemia trait: a new approach. *Haematologica*. 1987 Sep-Oct;72(5):409-13.
53. Ehsani MA, Shahgholi E, Rahiminejad MS, Seighali F, Rashidi A. A new index for discrimination between iron deficiency anemia and beta-thalassemia minor: results in 284 patients. *Pak J Biol Sci*. 2009 Mar 1;12(5):473-5.

54. Srivastava PC. Differentiation of thalassaemia minor from iron deficiency. *Lancet*. 1973 Jul 21;2(7821):154-5. doi: 10.1016/s0140-6736(73)93104-8.
55. Green R, King R. A new red cell discriminant incorporating volume dispersion for differentiating iron deficiency anemia from thalassemia minor. *Blood Cells*. 1989;15(3):481-91; discussion 492-5.
56. Sirdah M, Tarazi I, Al Najjar E, Al Haddad R. Evaluation of the diagnostic reliability of different RBC indices and formulas in the differentiation of the beta-thalassaemia minor from iron deficiency in Palestinian population. *Int J Lab Hematol*. 2008 Aug;30(4):324-330.
57. d'Onofrio G, Zini G, Ricerca BM, Mancini S, Mango G. Automated measurement of red blood cell microcytosis and hypochromia in iron deficiency and beta-thalassemia trait. *Arch Pathol Lab Med*. 1992 Jan;116(1):84-9. PMID: 1734838.
58. Lafferty JD, Crowther MA, Ali MA, Levine M. The evaluation of various mathematical RBC indices and their efficacy in discriminating between thalassemic and non-thalassemic microcytosis. *Am J Clin Pathol*. 1996 Aug;106(2):201-5. doi: 10.1093/ajcp/106.2.201. PMID: 8712174.
59. Bank A. Understanding globin regulation in beta-thalassemia: it's as simple as alpha, beta, gamma, delta. *J Clin Invest*. 2005 Jun;115(6):1470-3.
60. Jones SL, Ashton CM, Kiehne L, Gigliotti E, Bell-Gordon C, Disbot M, Masud F, Shirkey BA, Wray NP. Reductions in Sepsis Mortality and Costs After Design and Implementation of a Nurse-Based Early Recognition and Response. *Jt Comm J Qual Patient Saf*. 2015;41: 483-91.
61. Yamaguchi H, Haranaga S, Widen R, Friedman H, Yamamoto Y. Chlamydia pneumoniae infection induces differentiation of monocytes into macrophages. *Infect Immun*. 2002 May;70(5):2392-8.
62. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010 Oct 21;116(16):e74-80.
63. Tak T, van Groenendaal R, Pickkers P, Koenderman L. Monocyte Subsets Are Differentially Lost from the Circulation during Acute Inflammation Induced by Human Experimental Endotoxemia. *J Innate Immun*. 2017;9(5):464-474.
64. Piva E, Zuin J, Peloso M, Tosato F, Fogar P, Plebani M. Monocyte distribution width (MDW) parameter as a sepsis indicator in intensive care units. *Clin Chem Lab Med*. 2021 Mar 5;59(7):1307-1314.

## **10. ANEXOS**

## 10.1. Publicaciones a congresos nacionales e internacionales

### 10.1.1. Usefulness of Lymphocyte CPD parameters in Beckman Coulter DxH900 Hematology analyzer in lymphoproliferative chronic disorders and viral infection diagnosis.

González-Rodríguez P, García García B., Martínez-Iribarren A., Leis-Sestayo A., Tejedor-Ganduxé X., **Morales-Indiana C.** Usefulness of Lymphocyte CPD parameters in Beckman Coulter DxH900 Hematology analyzer in lymphoproliferative chronic disorders and viral infection diagnosis.

*Int Jnl. Lab. Hem. 2023; 45 (Suppl. 3) 3-137:41.*

#### ABSTRACTS

ISHL International Journal of Laboratory Hematology

WILEY 41

#### USEFULNESS OF LYMPHOCYTE CPD PARAMETERS IN BECKMAN COULTER DXH-900 HEMATOLOGY ANALYZER IN LYMPHOPROLIFERATIVE CHRONICAL DISORDERS AND VIRAL INFECTION DIAGNOSIS

Pablo González-Rodríguez<sup>1</sup>, Bea García-García<sup>2</sup>, Alicia Martínez-Iribarren<sup>1</sup>, Alba Leis-Sestayo<sup>1</sup>, Xavier Tejedor-Ganduxé<sup>1</sup>, Cristian Morales-Indiana<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory Medicine Department, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol Badalona, Spain, <sup>2</sup>Laboratory Medicine Department, Hospital Universitari Son Espases Palma de Mallorca, Spain

**Introduction:** Lymphocytosis is a frequent finding whose underlying cause may be hematologic, as in lymphoproliferative disorders (LPD), or non-hematologic, as in viral infection. These cases require smear review, in addition to frequently triggering more complex and costly tests such as flow cytometry or serology analysis. The number of publications investigating the relevance of cell population data (CPD) in differential diagnosis of lymphocytosis has increased significantly. The exploitation of these data can be a complementary tool to the manual review of the smear. **Methods:** 523 patients were included in the study: 316 with lymphocytosis ( $>5 \times 10^9/L$ ) and/or with variant lymphocyte flag (118 mononucleosis and 198 LPD; 176 chronic lymphocytic leukemias (CLL), 12 splenic marginal zone lymphomas (SMZL) and 10 mantle cell lymphomas (MCL)) and 207 patients without alterations as controls. Leukocyte and lymphocyte count were analyzed in addition to 14 CPD parameters (mean and standard deviation of volume, conductivity and the different light scattering angles (SM, SU, SL, SA, AL2)) on the Unicel-DxH900 (Beckman Coulter). A validation cohort of 32 mononucleosis and 52 LPD was included to validate the results obtained in the initial analysis. Parameters were compared using ANOVA test and the Bonferroni-Tukey test (post-hoc analysis). ROC curves were analyzed to evaluate the diagnostic performance of the parameters and a cut-off point was selected through Youden's index. The sensitivity (S), specificity (E), positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of the selected cut-off was calculated. **Results:** Most CPD parameters showed statistically significant differences between groups (table 1). Mean lymphocyte volume (MN-V-Li) was the parameter with better discriminant efficiency in LPD versus Mononucleosis (AUC = 0.882; 95% CI: 0.845-0.919;  $p < 0.001$ ). A MN-V-Li  $\leq 90$  cut-off point was selected showing a PPV = 89.8%, NPV = 77.1%, S = 84.6% and E = 84.4% to detect LPD in the validation cohort. **Conclusions:** Lymphocyte volume is a candidate positional parameter to be included in the decision algorithms of lymphocytosis. The inclusion of CPD data in the decision algorithms of routine clinical practice involves the optimization of the resources available to the laboratory and may provide highly valuable objective information.

Table 1. Values of lymphocyte CPD parameters and its statistical significant differences.

Parameter	Control		LPD (n=207)	MON (n=148)	MN (n=131)	P		
	Control (n=207)	LPD (n=148)				Control vs LPD	Control vs MN	LPD vs MN
Leucocyte ( $\times 10^9/L$ )	6.68 $\pm$ 1.3	27.48 $\pm$ 24.4	13.60 $\pm$ 4.6	<0.001	<0.001	<0.001		
Lymphocyte (%)	32.95 $\pm$ 7.0	74.96 $\pm$ 12.8	63.71 $\pm$ 10.1	<0.001	<0.001	<0.001		
Lymphocyte ( $\times 10^9/L$ )	2.16 $\pm$ 0.5	22.29 $\pm$ 23.4	8.77 $\pm$ 3.8	<0.001	<0.001	<0.001		
MN-V-Li	85.99 $\pm$ 3.2	64.33 $\pm$ 9.5	99.15 $\pm$ 8.7	0.002	<0.001	<0.001		
SD-V-Li	13.64 $\pm$ 1.1	17.44 $\pm$ 3.6	23.62 $\pm$ 4.9	<0.001	<0.001	<0.001		
MN-C-Li	114.80 $\pm$ 2.1	112.67 $\pm$ 5.6	112.23 $\pm$ 4.5	<0.001	<0.001	<0.001		
SD-C-Li	8.46 $\pm$ 1.3	11.06 $\pm$ 3.7	12.30 $\pm$ 3.3	<0.001	<0.001	<0.279		
MN-SM-Li	69.27 $\pm$ 4.4	61.02 $\pm$ 10.7	69.5 $\pm$ 8.4	<0.001	<0.001	<0.001		
SD-SM-Li	16.76 $\pm$ 1.0	16.43 $\pm$ 3.4	21.68 $\pm$ 3.1	<0.001	<0.001	<0.001		
MN-SU-Li	69.07 $\pm$ 5.6	55.79 $\pm$ 12.4	62.79 $\pm$ 8.6	<0.001	<0.001	<0.001		
SD-SU-Li	18.19 $\pm$ 1.3	21.78 $\pm$ 4.1	24.12 $\pm$ 2.7	<0.001	<0.001	<0.001		
MN-SL-Li	62.17 $\pm$ 3.9	58.68 $\pm$ 10.7	60.96 $\pm$ 8.7	<0.001	<0.001	<0.001		
SD-SL-Li	18.54 $\pm$ 0.9	20.61 $\pm$ 3.1	22.88 $\pm$ 3.1	<0.001	<0.001	<0.001		
MN-SA-Li	34.76 $\pm$ 2.2	30.09 $\pm$ 5.0	38.13 $\pm$ 7.3	<0.001	<0.001	<0.001		
SD-SA-Li	9.59 $\pm$ 0.9	9.88 $\pm$ 2.2	13.12 $\pm$ 2.0	0.252	<0.001	<0.001		
MN-AL2-Li	93.60 $\pm$ 8.8	70.04 $\pm$ 13.1	81.91 $\pm$ 11.9	<0.001	<0.001	<0.001		
SD-AL2-Li	11.66 $\pm$ 1.2	12.34 $\pm$ 2.2	15.86 $\pm$ 3.3	0.009	<0.001	<0.001		

LPD: lymphoproliferative disorders; MON: mononucleosis; Li: lymphocyte; MN: mean; SD: standard deviation; V: cell volume; C: conductivity; SM: mean angle (9-47°) scattering; SU: upper angle (20-47°) scattering; SL: lower angle (5-19°) scattering; SA: axial angle (5°) scattering; AL2: angle  $\alpha/2'$  scattering.

## 10.1.2. Clinical implementation of a new formula in differential diagnosis of microcytic anemia.

Elena Rufo-Vicente, Alba Leis-Sestayo, Alicia Martínez-Iribarren, M. Àngels Sala-Sanjaume, M. Ángel García-Martín, Komal Qayyum, Joel Rodríguez-Ayala, **Cristian Morales-Indianó**. Clinical implementation of a new formula in differential diagnosis of microcytic anemia.

*Int. Jnl. Lab. Hem. 2023 45 (Suppl. 1) 1-211: 151.*

ISLH 2022 Abstract Proceedings 151

### CLINICAL IMPLEMENTATION OF A NEW FORMULA IN DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF MICROCYTIC ANEMIA.

Elena Rufo-Vicente, Alba Leis-Sestayo, Alicia Martínez-Iribarren, MÀngels Sala-Sanjaume, MÀngel García-Martín, Komal Qayyum, Joel Rodríguez-Ayala, Cristian Morales-Indianó

*Laboratory Medicine Department. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Badalona. Barcelona, Spain*

**Introduction:** Iron deficiency anemia (AF) and β-thalassemia (BT) are the leading causes of microcytic anemia. Differences in the Hematology parameters of both entities have contributed to the emergence of various indices to direct the diagnosis towards one type or another of anemia. Cell Population Data (CPD) define qualitative characteristics of different cell populations using VCSn technology in Beckman Coulter's DxH analyzers. This technology combines volume, conductivity and scattering of laser light at 5 angles, providing a mean and standard deviation (SD) for each cell population. The aim of the study was to evaluate the utility of reticulocyte (RET) and erythrocyte (NonRET) CPD in the differential diagnosis between AF and BT. **Methods:** -210 samples (AF:102; BT:108) analyzed by DxH-900 were included. Erythrocyte and reticulocyte parameters were collected. Mean and SD of CPD of RET and NonRET population were analyzed. -278 samples analyzed by DxH-800 were retrieved from a previous study (AF:148; BT:130) increasing the number of patients to 488 (AF:250; BT:238). There were no statistically significant differences between hematology parameters and CPD of the two cohorts of patients (DxH800 vs DxH900). -Formula  $[RBC^*(MCRET+SDCRET)*1000]/(MVNonRET*RDWSD*MCV)$  was studied to corroborate its reproducibility in different populations. -T-student test was used to evaluate differences between groups (AF and BT) (significant  $p < 0.05$ ). The area under the curve (AUC) was calculated by analyzing ROC curves. The SPSS v25.0 was used. **Results:** Most of the parameters analyzed showed significant differences between the two groups (table 1). Regarding CPD, conductivity value of RETs and Non-RETs was significantly higher in patients with BT than in AF ( $p < 0.001$ ). In contrast, the volume value was significantly lower ( $p < 0.001$ ). The AUC showed optimal performance for all CPD except for SD of volume (table 2). Our formula  $[RBC^*(M-C-RET+SD-C-RET)*1000]/(M-V-NonRET*RDW-SD*MCV)$  showed an AUC of 0.981 (95% CI: 0.968-0.993;  $p < 0.001$ ) for differential diagnosis between AF and BT (table 2). Cutoff point  $>3.6$  showed sensitivity of 94.5% and specificity of 94.8% for BT diagnosis. The Youden index was 89.3%. **Conclusions:** Volume and conductivity CPD reflect morphometric

changes in erythrocyte and reticulocyte populations. Our formula  $[RBC^*(MCRET+SDCRET)*1000]/(MVNonRET*RDWSD*MCV)$  showed a high discriminatory capacity between AF and BT. Its implementation as a screening tool in the daily routine would be beneficial for the early diagnosis of the type of anemia.

Table 1. Comparison of means of the different magnitudes between subjects with AF and BT.

Magnitudes	AF (n=250)	BT (n=108)	P AF vs BT
RBC (x10 <sup>12</sup> /L)	4.65	5.76	p<0.001
Hb (g/dL)	10.61	11.88	p<0.001
Hct (%)	33.38	37.29	p<0.001
MCV (fL)	75.08	64.87	p<0.001
MCH (pg)	23.87	20.61	p<0.001
MCHC (g/dL)	31.73	31.76	p=0.736
RDW (%)	18.49	16.70	p<0.001
RDW-SD	48.59	32.73	p<0.001
Reticulocytes (x10 <sup>9</sup> /L)	62.23	95.99	p<0.001
Reticulocytes (%)	1.41	1.67	p<0.001
M-V-RET	53.45	46.18	p<0.001
SD-V-RET	14.44	13.78	p<0.001
M-C-RET	73.87	82.62	p<0.001
SD-C-RET	17.29	22.71	p<0.001
M-V-NonRET	37.96	33.72	p<0.001
SD-V-NonRET	11.17	10.47	p<0.001
M-C-NonRET	74	83.65	p<0.001
SD-C-NonRET	17.33	23.63	p<0.001

AF: iron deficiency anemia; BT: β-thalassemia; RBC: red blood cell count; Hb: hemoglobin; Hct: hematocrit; MCV: mean cell volume; MCH: mean cell hemoglobin; MCHC: mean cell hemoglobin concentration; RDW: red cell distribution width; RDW-SD: standard deviation of RDW; M-V-RET: mean of the volume of the reticulocyte population; SD-V-RET: standard deviation of the volume of the reticulocyte population; M-C-RET: mean of the conductivity of the reticulocyte population; SD-C-RET: standard deviation of the conductivity of the reticulocyte population; M-V-NonRET: mean of the volume of the non reticulocyte population; SD-V-NonRET: standard deviation of the volume of the non reticulocyte population; M-C-NonRET: mean of the conductivity of the non reticulocyte population; SD-C-NonRET: standard deviation of the conductivity of the non reticulocyte population.

Table 2. AUC and our formula  $[RBC^*(MCRET+SDCRET)*1000]/(MVNonRET*RDWSD*MCV)$ .

CPD/Normala	AUC	IC95%	P
M-V-RET	0.935	[0.878-0.931]	p<0.001
SD-V-RET	0.633	[0.584-0.682]	p<0.001
M-C-RET	0.832	[0.664-0.920]	p<0.001
SD-C-RET	0.892	[0.762-0.942]	p<0.001
M-V-NonRET	0.842	[0.807-0.877]	p<0.001
SD-V-NonRET	0.686	[0.639-0.733]	p<0.001
M-C-NonRET	0.511	[0.484-0.537]	p<0.001
SD-C-NonRET	0.837	[0.803-0.873]	p<0.001
$[RBC^*(MCRET+SDCRET)*1000]/(MVNonRET*RDWSD*MCV)$	0.981	[0.968-0.993]	p<0.001

M-V-RET: mean of the volume of the reticulocyte population; SD-V-RET: standard deviation of the volume of the reticulocyte population; M-C-RET: mean of the conductivity of the reticulocyte population; SD-C-RET: standard deviation of the conductivity of the reticulocyte population; M-V-NonRET: mean of the volume of the non reticulocyte population; SD-V-NonRET: standard deviation of the volume of the non reticulocyte population; M-C-NonRET: mean of the conductivity of the non reticulocyte population; SD-C-NonRET: standard deviation of the conductivity of the non reticulocyte population.

### 10.1.3. Detecting cytological dysplasia: usefulness of cell morphology parameters offered by DxH900 hematology analyzer.

Alicia Martínez-Iribarren, Alba Leis-Sestayo, M. Ángel García-Martín, Elena Rufo-Vicente, M. Angels Sala-Sanjaume, Komal Qayyum, María Fuster-Pérez, **Cristian Morales-Indianó**. Detecting cytological dysplasia: usefulness of cell morphology parameters offered by DxH900 hematology analyzer.

*Int. Jnl. Lab. Hem. 2023 45 (Suppl. 1) 1-211: 115.*

ISLH 2022 Abstract Proceedings 115

#### DETECTING CYTOLOGICAL DYSPLASIA: USEFULNESS OF CELL MORPHOLOGY PARAMETERS OFFERED BY DXH900 HEMATOLOGY ANALYZER

*Alicia Martínez-Iribarren, Alba Leis-Sestayo, M. Ángel García-Martín, Elena Rufo-Vicente, M. Angels Sala-Sanjaume, Komal Qayyum, María Fuster-Pérez, Cristian Morales-Indianó*  
*Laboratory Medicine Department. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Badalona, Spain*

**Introduction:** Recognition of cytological dysplasia(CD) is the cornerstone of diagnosis, classification and prognosis of myelodysplastic syndromes (MDS). However, evaluation of neutrophils'CD (nCD) is likely to show variability among observers. When performing cell blood count and differential(CBC-DIFF), hematological analyzers provide the so-called Cell morphology parameters(CMP), which could be useful in identification of nCD, especially the ones related to laser scatter, as they reflect cellular complexity (segmentation and granularity).The aim of the study was to evaluate if CMP correlate with nCD as a MDS screening tool. **Methods:** 83 peripheral blood(PB) samples were included:42 from MDS patients and 41 from healthy individuals(control-group). PB smears were revised by two experienced observers who evaluated % hypogranulated(%hypogr) and % hyposegmented(%hyposg) neutrophils by digital microscopy(CellavisionDM9600). Differences among observers over 10% were corrected with a third observer. Samples were processed in DxH900 analyzer (Beckman-Coulter, USA) and neutrophils' CMP were obtained by VCS technology: volume(MN-V-NE, SD-V-NE), conductivity(MN-C-NE, SD-C-NE) and laser scatter in different angles(MN-SM-NE, SD-SM-NE, MN-SU-NE, SD-SU-NE, MN-SL-NE, SD-SU-NE, MN-SA-NE, SD-SA-NE, MN-AL2-NE and SD-AL2-NE). Differences in medians between groups were calculated with Mann-Whitney test and association between variables by Spearman correlation. Diagnostic performance was assessed by ROC curve. Statistical analysis was performed using SPSS(v.25.0) and MedCalc(v.19.5.3) **Results:** Most of the CMP showed differences between MDS and control group(Table\_1). CMP correlated with presence of hypogranulated or hyposegmented neutrophils(Table\_2), mainly the variation in neutrophils' volume (SD-V-NE) and cytoplasm granulation (SD-SU-NE). Individually, SD-SU-NE and SD-V-NE yielded the best diagnostic performance [AUC(CI95%)] to predict presence of >10%hypogr (SD-SU-NE: 0,904 (0,834-0,975); SD-V-NE: 0,917(0,834-0,967)) or >10% hyposg (SD-SU-NE: 0,876(0,784-0,938); SD-V-NE: 0,867(0,773-0,932)). Combination of both increased AUC to 0,942(0,867-0,982). **Conclusions:** CMP related to neutrophil distribution width (SD-V-NE) and complexity

(SD-SU-NE) reflect CD in neutrophils' population. Their implementation in clinical practice could help in early diagnosis of MDS.

	MDS group Median [IQR]	Control group Median [IQR]
MN-V-NE	155 (145-176,5)	151 (145-154)
SD-V-NE *	23,09 (20,49-26,73)	18,32 (17,49-19,97)
MN-C-NE *	139 (135,5-142,9)	143 (142-144)
SD-C-NE *	5,67 (5,15-6,81)	4,84 (4,42-5,27)
MN-SM-NE *	129 (124-133)	130 (132,5-141,5)
SD-SM-NE *	12,5 (11,16-13,98)	10,51 (10,21-11,29)
MN-SU-NE *	131 (122-142)	127 (126-142)
SD-SU-NE *	15,24 (14,89-16,69)	13,82 (13,73-14,9)
MN-SL-NE *	121 (115-129)	129 (126-137)
SD-SL-NE *	14,74 (13,26-15,71)	14,23 (13,65-15,27)
MN-SA-NE	149 (135-152,5)	145 (136,5-157)
SD-SA-NE *	25,82 (20,52-37,22)	20,37 (28,14-83,12)
MN-AL2-NE	130 (121-160,5)	138 (130-144)
SD-AL2-NE *	17,25 (14,96-20,06)	12,31 (11,72-14,98)

\* p<0,05

IQR: interquartile range

Table 1. Differences in medians between groups.

	% hypogr	% hyposg
MN-V-NE	r 0,63**	0,724**
SD-V-NE	r 0,753**	0,727**
MN-C-NE	r -0,458 **	-0,454**
SD-C-NE	r 0,361**	0,167
MN-SM-NE	r -0,422**	-0,067
SD-SM-NE	r 0,271*	0,022
MN-SU-NE	r -0,356**	-0,019
SD-SU-NE	r 0,608**	0,430**
MN-SL-NE	r -0,079	0,06
SD-SL-NE	r -0,011	-0,303**
MN-SA-NE	r 0,110	0,245*
SD-SA-NE	r 0,083	0,072
MN-AL2-NE	r 0,348**	0,372**
SD-AL2-NE	r 0,365**	0,297**

r: Pearson correlation

\*\* p<0,01

\* p<0,05

Table 2. CMD correlation with CMP.

## 10.1.4. Distinction between myelodysplastic síndrome and nonclonal cytopenias by celular morphometric parameters analysis

**Cristian Morales-Indianó**, Alicia Martínez-Iribarren, María López-Molina, Xavier Tejedor-Ganduxé, Agueda Ancochea, Carla Fernández Prendes, M<sup>a</sup>José Jiménez Lorenzo, M<sup>a</sup>Àngels Sala Sanjaume, Josep María Ribera Santasusana, M<sup>a</sup>Antonia Llopis Díaz MA., Blanca Xicoy Cric. Distinction between myelodysplastic síndrome and nonclonal cytopenias by celular morphometric parameters analysis.

*Int. Jnl. Lab. Hem. 2019 41 (Suppl. 2) 1-204:122.*

122 ISLH 2019 Abstract Proceedings

### DISTINCTION BETWEEN MYELODYSPLASTIC SYNDROME AND NONCLONAL CYTOPENIAS BY CELLULAR MORPHOMETRIC ANALYSIS.

CRISTIAN MORALES-INDIANÓ<sup>1</sup>, ALICIA MARTÍNEZ-IRIBARRE<sup>1</sup>, MARÍA LÓPEZ-MOLINA<sup>1</sup>, XAVIER TEJUDOR GANDUXÉ<sup>1</sup>, AGUEDA ANCOCHEA<sup>2</sup>, CARLA FERNÁNDEZ PRENDES<sup>1</sup>, M<sup>a</sup>JOSÉ JIMÉNEZ LORENZO<sup>2</sup>, M<sup>a</sup>ÀNGELS SALA SANJAUME<sup>1</sup>, JOSEP MARÍA RIBERA SANTASUSANA<sup>2</sup>, M<sup>a</sup>ANTONIA LLOPIS DÍAZ<sup>2</sup>, BLANCA XICOY CIRIC<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Core-Hematology Department. Clinical Laboratory Metropolitana Nord (LCMN). Hospital Universitari Germans Trias i Pujol BADALONA, Spain, <sup>2</sup>Hematology Department. Institut Català d'Oncologia. Hospital Germans Trias i Pujol. BADALONA, Spain

**Introduction:** Myelodysplastic syndromes (MDS) are clonal diseases of the hematopoietic stem cells that are characterized by cytopenia and dysplasia in peripheral blood. The diagnosis of morphological dysplasia is complex, subjective, presenting a high interobserver variability. Besides MDS, different pathologies can present cytopenias and differentiating between a benign and a malign pathology is necessary. The complete blood count(CBC) and differential leukocyte analysis allow the detection of cytopenias reliably. In recent years, hematology analyzers provide information about cell morphology through new population's parameters. These morphology parameters (CMPs) could be useful in early MDS diagnosis. The aim was to assess diagnosis efficiency of CMPs in MDS diagnosis and compared it with benign cytopenias. **Methods:** 102 patients were included in the study and divided in 3-groups:23-MDS, 48 patients with hepatopathy(HP) and 31 with chronic renal disease(CRD). The inclusion criteria were: total leucocytes< 4,0x10<sup>9</sup>/L and cytopenia (hemoglobin< 10 g/dL, neutrophils< 1,8x10<sup>9</sup>/L and/or platelets< 100x10<sup>9</sup>/L). All samples were run on the DxH-800 Analyzer (Beckman Coulter, Miami, FL,USA). We obtained the CMPs of leucocytes: volume(V), conductivity(C) and different angle laser dispersion (SM, SU, SL, SA and AL2). The means differences of CMPs were compared by ANOVA-test. Significant p-values were those< 0.05. The diagnostic capacity to identify correctly the MDS with cytopenia was assessed with ROC curve analysis. **Results:** We found statistical difference in neutrophil **SU** (MDS:132.5±8.0 vs HP:140.0±4.8 vs CRD:137.7±6.3;p< 0.001) and **SL** (MDS:127.6±7.4 vs HP:137.0±7.9 vs CRD:132.4±11.7; p< 0.001) but not statistical in V and C (table-1). Neutrophil **SU** and **SL** angle laser dispersion showed an AUC of 0.782 (IC:0.661-0.903;p< 0.001) and 0.775 (0.671-0.879;p< 0.001), respectively. The **MDS index** [(SU-NEU + SL-NEU) x NEU%/100] showed the best efficiency in distinguishing MDS-cytopenia from benign cytopenia with AUC:0.911 (IC:0.848-0.975;p< 0.001)(table-2). **Conclusions:** Many pathologies present cytopenia and detecting MDS is essential. The combination of neutrophils count with SU and SL dispersion angle could be useful in the identification of

MDS. The MDS index showed the highest diagnostic efficiency differentiating between malignant and benign cytopenias, especially when white cell count is lower.

Table 1. Mean comparison between complete cell counts in three different groups.

Parameter	MDS-23 (xstd)	HP-48 (xstd)	CRD-31 (xstd)	P
Age (years)	75.6±11.5	80.2±14.6	81.4±13.2	<0.001*
Leucocytes (x10 <sup>9</sup> /L)	3.02±0.7	3.08±0.7	3.21±0.7	0.806
Neutrophils (x10 <sup>9</sup> /L)	1.35±0.6	1.80±0.6	1.71±0.6	<0.001*
Neutrophils (%)	34.45±3.4	56.35±3.0	52.31±6.1	<0.001*
Hemoglobin (g/dL)	9.85±2.0	11.01±2.3	11.45±2.0	0.005*
Platelets (x10 <sup>9</sup> /L)	146.02±7.1	120.82±9.8	155.42±7.5	0.062
V-NEU	140.52±0.0	144.92±1.1	140.22±1.0	0.084
C-NEU	143.42±0.9	144.32±2.8	145.15±4.7	0.336
SM-NEU (SU-NEU <sup>2</sup> )	131.05±0.8	139.22±0.0	135.22±0.2	0.306
SL-NEU (20-43°)	132.51±0.0	140.03±0.8	137.75±8.3	<0.001*
SL-NEU (9-18°)	127.85±7.4	137.26±7.9	132.45±11.7	<0.001*
SA-NEU (9°)	163.75±3.0	168.05±3.0	163.85±16.6	0.496
AL2-NEU (9°)	147.82±8.9	149.42±7.5	150.85±10.9	0.002*
MDS index				
[(SU-NEU + SL-NEU)/100]	90.32±3.6	157.32±7.2	169.42±6.7	<0.001*

\*statistical significant difference (p<0.05). MDS: myelodysplastic syndrome, HP: hepatopathy, CRD: chronic renal disease. X: mean, s: standard deviation. NEU: neutrophils, V: volume, C: conductivity, SM: mean angle (9-43°), SH: high angle (20-43°), SL: low angle (9-18°), SA: axial angle (9°), AL2: angle 2 x 9°.

Table 2. Receiver operating characteristic curve analysis for predicting cytopenias.

Parameter	AUC	IC 95%	P
SU-NEU	0.782	0.661-0.903	<0.001*
SL-NEU	0.775	0.671-0.879	<0.001*
MDS index	0.911	0.848-0.975	<0.001*
[(SU-NEU + SL-NEU)/100]			

\*statistical significant difference (p<0.05) MDS: myelodysplastic syndrome, HP: hepatopathy, CRD: chronic renal disease. NEU: neutrophils, SU: high angle (20-43°), SL: low angle (9-18°).

## 10.1.5. Análisis de los Cell Population Data (CPD) en personas sanas y en pacientes con Síndrome Mielodisplásico (SMD).

**Morales Indiano C.,** Nieto Moragas J., Martínez Iribarren A., Tejedor Ganduxé X., Triguero Moreno A., Sarrate García E., Díaz Martínez Y., Rodríguez Hernández I., Sierra Martínez I., Galiano Alcalá L., Sala Sanjaume M<sup>a</sup>À., Orna Montero E., Navarro Ferrando J.T., Ribera Santasusana J.M., Llopis Díaz M<sup>a</sup>., Xicoy Cirici B. Análisis de los Cell Population Data (CPD) en personas sanas y en pacientes con Síndrome Mielodisplásico (SMD).

*Haematologica. 2017 102 (S4) 1-395: 162*

Póster

(n=11) y Anemia Refractaria con Sideroblastos en Anillos (ARSA) (n=14). Los hemogramas se procesaron con el analizador DxH-800 (Beckman Coulter, Miami, USA). Se analizó la M y SD para los CPD (V y C y DLL) de la población leucocitaria de neutrófilos. Se comparó la diferencia de medias de la concentración absoluta de neutrófilos con la prueba *t*-student y de los CPD con la prueba U-Mann Whitney, considerándose significativa una p<0,05. Se calculó el rendimiento diagnóstico de los CPD mediante el área bajo la curva (AUC) de las curvas *Receiever Operating Characteristic* (ROC), con un intervalo de confianza del 95% (IC95) considerándose significativos aquellos con una AUC ≥0,75.

**Resultados:** Los pacientes con SMD presentaron significativamente, una concentración absoluta de neutrófilos inferior a la de las PS (2,4±2,1x10<sup>9</sup>/μL vs. 3,7±1x10<sup>9</sup>/μL, p<0,001). Los neutrófilos de pacientes con SMD presentaron un menor V y C respecto a las PS (tabla 1). Además, en pacientes con SMD la M para la DLL en la mayoría de ángulos fue significativamente menor, con mayor DE en estos mismos parámetros (tabla 1). Cinco CPD presentaron un óptimo rendimiento (AUC>0,75) para diferenciar pacientes con SMD y PS (tabla 2).

**Conclusiones:** Los neutrófilos de pacientes con SMD presentaron menor concentración absoluta y menor valor en los CPD (V, C y DLL en la mayoría de ángulos) respecto a las PS. Algunos CPD del hemograma presentaron un óptimo rendimiento para diferenciar PS y pacientes con SMD.

Financiado en parte con la beca PI10/01417 del Fondo de Investigaciones Sanitarias, RD12/0036/0029 de RTICC, Instituto Carlos III, 2014SGR225(GRE), Generalitat de Catalunya, y una ayuda de la Fundación "La Caixa".

**Tabla 1. Comparación de medias de los diferentes parámetros entre los grupos estudiados.**

Parámetro	PS=60 M (IQ)	SMD=54 M (IQ)	Z	p
M-V-NE	156 (151,2-162,8)	147 (139-156)	-4,459	<0,001*
DE-V-NE	20,2 (19,2-21,9)	18,5 (17,6-21,5)	-2,965	0,010
M-C-NE	148 (144-149,8)	141 (138-143)	-6,476	<0,001*
DE-C-NE	6,2 (5,6-7,0)	5,3 (4,7-6,1)	-4,030	0,001*
M-SM-NE	159 (154,8-161,8)	151 (147,3-157)	-2,492	0,156
DE-SM-NE	10,0 (9,6-10,4)	11,7 (10,4-13,0)	-6,148	<0,001*
M-SU-NE	139 (136-142)	134 (130-138,2)	-3,703	<0,001*
DE-SU-NE	10,5 (10,1-11,0)	12,2 (11,3-14,4)	-6,728	<0,001*
M-SL-NE	129 (124,6-131,0)	129 (124,0-134,0)	-0,125	0,901
DE-SL-NE	13,8 (13,0-14,4)	14,0 (13,0-16,1)	-1,669	0,095
M-SA-NE	163 (157-169)	157 (147,5-168,5)	-1,945	0,052
DE-SA-NE	90,1 (89,8-93,1)	80,2 (77,8-83,9)	-0,485	0,628
M-AL2-NE	153 (150-156,8)	144 (138,5-155)	-6,778	<0,001*
DE-AL2-NE	11,2 (10,5-12,4)	11,5 (10,3-13,7)	-0,899	0,368

\*: Diferencias significativas (p<0,05). PS: personas sanas. SMD: Pacientes con síndrome mielodisplásico. Z: estadístico U-Mann Whitney. M: mediana. IQ: intervalo intercuartil. DE: desviación estándar. NE: neutrófilos. V: volumen. C: conductividad. SM: ángulo medio (9-43°). SU: ángulo alto (20-43°). SL: ángulo bajo (9-19°). SA: ángulo anular (5°). AL2: ángulo a 0°.

**Tabla 2. AUC para los CPD estudiados.**

Fórmula	AUC	IC 95%	p
M-V-NE	0,750	0,648-0,844	<0,001
M-C-NE	0,857	0,784-0,930	<0,001
DS-SM-NE	0,840	0,760-0,919	<0,001
DS-SU-NE	0,872	0,797-0,946	<0,001
M-AL2-NE	0,758	0,656-0,860	<0,001

\*: Diferencias significativas (p<0,05). M: media. SD: desviación estándar. NE: neutrófilos. V: volumen. C: conductividad. SM: ángulo medio (9-43°). SU: ángulo alto (20-43°). AL2: ángulo a 0°. AUC: área bajo la curva; IC: intervalo de confianza.

**PC-137**

### ANÁLISIS DE LOS CELL POPULATION DATA (CPD) EN PERSONAS SANAS Y EN PACIENTES CON SÍNDROME MIELODISPLÁSICO (SMD)

Morales Indiano C.<sup>1</sup>, Nieto Moragas J.<sup>1</sup>, Martínez Iribarren A.<sup>1</sup>, Tejedor Ganduxé X.<sup>1</sup>, Triguero Moreno A.<sup>1</sup>, Sarrate García E.<sup>1</sup>, Díaz Martínez Y.<sup>1</sup>, Rodríguez Hernández I.<sup>2</sup>, Sierra Martínez I.<sup>2</sup>, Galiano Alcalá L.<sup>1</sup>, Sala Sanjaume M<sup>a</sup>À.<sup>1</sup>, Orna Montero E.<sup>2</sup>, Navarro Ferrando J.T.<sup>2</sup>, Ribera Santasusana J.M.<sup>2</sup>, Llopis Díaz M<sup>a</sup>., Xicoy Cirici B.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratori Core-Hematología. Laboratori Unificat Metropolitana Nord (LUMN). Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona. ICS Gerència Territorial Metropolitana Nord., <sup>2</sup>Servicio Hematología. Institut Català d'Oncoologia, Badalona. Josep Carreras Leukemia Research Institute. Universitat Autònoma de Barcelona

**Objetivo:** El hemograma es la prueba guía ante la sospecha de la presencia de una hemopatía y el estudio de parámetros hematométricos adicionales pueden ayudar a la detección precoz de posibles SMD, hemopatías malignas que se caracterizan por citopenias y displasia en sangre periférica. Los "Cell Population Data (CPD)" son datos numéricos proporcionados por el analizador hematológico DxH-800 que definen características cualitativas de diferentes poblaciones celulares, mediante la tecnología AIN de Beckman Coulter. En ella se combina Volumen (V), Conductividad (C) y Dispersión de la luz láser (DLL) en 5 ángulos distintos (MALS (9-43°), UMALS (20-43°), LMALS (9-19°), LALS (5°) y AL2 (0°)) proporcionando una media (M) y desviación estándar (DE) de cada población analizada. El objetivo de este estudio fue describir y comparar la concentración absoluta de neutrófilos, el valor de los CPD de los neutrófilos y su rendimiento diagnóstico en personas sanas (PS) y en pacientes diagnosticados de SMD mediante el autoanalizado DxH-800 (Beckman Coulter).

**Pacientes y Métodos:** Se incluyeron 60 PS y 54 pacientes con SMD (Citopenia Refractaria con Displasia Multilineal (CRDM) (n=18), SMD con delección 5q- (n=11), Anemia Refractaria con Exceso de Blastos (AREB)

## 10.1.6. Influence of K2-EDTA and K3-EDTA tubes for monocyte distribution width measurement.

M. Lopez-Molina, X. Tejedor Ganduxé, A. Martínez Iribarren, M. Espinosa, S. Torres, MA. Sala, C. Fernandez, C. Abadia, MA. Llopis, **C. Morales-Indianó**. Influence of K2-EDTA and K3-EDTA tubes for monocyte distribution width measurement.

*Int. Jnl. Lab. Hem. 2019 41 (Suppl. 2) 1-204: 103.*

ISLH 2019 Abstract Proceedings 103

### INFLUENCE OF K2-EDTA AND K3-EDTA TUBES FOR MONOCYTE DISTRIBUTION WIDTH MEASUREMENT

*Maria Lopez-Molina, Xavier Tejedor Ganduxé, Alicia Martinez Iribarren, Merce Espinosa, Silvia Torres, MªAngels Sala, Carla Fernandez, Chantal Abadia, MªAntonia Llopis, Cristian Morales-Indianó  
Hematology-CoreLab Department, Clinical Laboratory Metropolitana Nord (LCMN). Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Badalona(Barcelona), Spain*

**Introduction:** Ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA) is the anticoagulant of choice for hematology testing. Mainly, EDTA comes in blood tubes as dipotassium (K2) and tripotassium (K3) salts. It has been recognized that potassium's concentration salt may affect the accuracy of cell blood counting, cell sizing and probably its stability. EDTA-salt may cause shrinkage of erythrocytes, affect mean corpuscular volume and mean platelet volume. These effects are more significant in K3-EDTA than in K2-EDTA. Monocyte Distribution Width(MDW) is a new morphology parameter available on the new DxH-900 hematology analyzer of Beckman Coulter, which could potentially be useful for early sepsis detection. The aim was to evaluate the differences in MDW using 2 different EDTA-tubes(K2 and K3 salts) and to study its stability over time in both anticoagulants.

**Methods:** A 25 healthy volunteers(80% women) were studied. For each one we recollected two different EDTA-tubes(K2 and K3, BD Vacutainer®). Samples were tested at different times(0hour (h), 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h and 48h) and stored at room temperature during the study. All samples were run on the DxH-900 Analyzer (Beckman Coulter; Miami, FL, USA). The differences between K2 and K3 at time 0h were assessed by paired Student's t-test. Significant P values were values below 0.05. To assess stability, the percentage change [(the mean of result at time X – mean of result at 0h)/mean of result at 0h]\*100 was calculated. We established a significant difference for MDW when the change percentage(CP%) was >10%

**Results:** A significant 2 points difference was found between K2 and K3 for MDW at 0h (K2: 16.12±1.57 vs K3: 18.33±1.75; p< 0.001). This difference was maintained for most of the analyzed times. The value of the MDW remained stable until 8h in both EDTA-tubes (CP%-K2: 1h=5.2%; 2h=2.6%; 4h=5.0%; 6h=6.4%; 8h=8.4%; 24h=19.4% and CP%-K3: 1h=4.2%; 2h=2.6%; 4h=5.3%; 6h=5.9%; 8h=8.6%; 24h=19.8%).

**Conclusions:** In our preliminary study, we found significant differences in the MDW over 2 points between K2 and K3 EDTA-tubes in all the analyzed times. MDW showed CP< 10% in the first 8 hours of the venipuncture. New morphological parameters such as MDW should be evaluated according to the EDTA tube used.

## 10.1.7. Usefulness of cell morphology parameters for detection and diagnosis of acute leukemias.

Martínez Iribarren, M. Lopez-Molina, X. Tejedor Ganduxé, MA. Sala Sanjaume, A. Ancochea, L. Galiano, A. Castillo, C. Fernandez-Prendes, MA Llopis Diaz, **C. Morales-Indianó**. Usefulness of cell morphology parameters for detection and diagnosis of acute leukemias.

*Int. Jnl. Lab. Hem. 2019 41(Suppl. 2)1-204: 109.*

ISLH 2019 Abstract Proceedings 109

### USEFULNESS OF CELL MORPHOLOGY PARAMETERS FOR DETECTION AND DIAGNOSIS OF ACUTE LEUKEMIAS.

Alicia Martínez-Iribarren<sup>1</sup>, María López-Molina<sup>1</sup>, Xavier Tejedor-Ganduxé<sup>1</sup>, M<sup>a</sup> Ángela Sala-Sanjaume<sup>1</sup>, Agueda Ancochea<sup>2</sup>, Lucía Galiano<sup>1</sup>, Alicia Castillo<sup>1</sup>, Carla Fernández-Prendes<sup>1</sup>, M<sup>a</sup> Antonia Llopis-Díaz<sup>1</sup>, Cristian Morales-Indianó<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratori Clínic Metropolitana Nord. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol Badalona, Spain,

<sup>2</sup>Institut Català d'Oncologia. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol Badalona, Spain

Table 1: Receiver operating characteristic curve analysis for the determination of AL types

parameter	AUC	CI 95%	p
V-Ne	0,765	0,613-0,917	0,021
SU-Ne	0,788	0,631-0,945	0,012
C-Ne	0,733	0,545-0,921	0,043
SU-Mo	0,852	0,715-0,990	0,002

Statistical significant difference (p<0.05). NE: neutrophils. V: volume. C: conductivity. Mo: monocytes SU: high angle (20-43°). AUC: area under curve. CI: confidence interval.

**Introduction:** Acute leukemia (AL) starts in the marrow bone and is characterized by an uncontrolled, fast and, if not treated, fatal process, in which immature cells invade blood. It's necessary to have an integrated laboratory diagnosis, including cell blood count (CBC) with differential leukocyte, morphology, cytogenetics, immunophenotype and molecular biology. The CBC and differential leukocyte is the first step in AL detection. In recent years, technology has improved and new morphological parameters that could help in AL approach have been developed. The aim of this study was to assess the usefulness of cell morphology parameters (CMP) obtained from combining volume (V), conductivity (C) and laser dispersion (Sn) of different cells in AL diagnosis. **Methods:** We evaluated 92 samples (43 new AL diagnoses and 49 healthy controls). The patients presenting AL were classified into two groups: 35 patients with acute myeloid leukemia (AML) and 9 with acute lymphocytic leukemia (ALL). Patients of AML group were divided according to morphological FAB classification in 29 AML (M0+M1), 3 promyelocytic AL (PAL;M3) and 3 monocyte AL (LAMM;M4+M5). All samples were run on the DxH-800 Analyzer (Beckman Coulter; Miami, FL, USA). We analyzed CMP in all groups. ANOVA test and ROC curve were performed to assess differences between groups. Significant p values were those below 0.05. **Results:** There were no differences in quantitative results of CBC between AML and ALL. Concerning CMP values, blasts in AML presented higher significant V and Sn in neutrophils distribution zone compared to ALL (V-Ne-AML:159.8±24.3vs V-Ne-ALL:146.3±9.0; p< 0.013. Sn-Ne-AML:16.8±5.1 vs Sn-Ne-ALL:12.4±2.0; p< 0.001). ALL blasts showed higher significant Sn in monocytes distribution zone (Sn-Mo-AML:13.9±2.7 vs Sn-Mo-ALL:18.1±3.3; p=0.001). PAL showed higher significant monocytes' conductivity compared with the rest of AL (p< 0.001). CMP with better diagnostic accuracy for distinguishing between AML and ALL were Sn-Ne (AUC: 0.788 (IC<sub>95%</sub>: 0.631-0.945; p=0.012)) and SU-Mo (AUC: 0.852 (IC<sub>95%</sub>: 0.715-0.990; p=0.012)). **Conclusions:** The CBC along with the CMP, especially those related with laser dispersion, could be useful in early diagnosis and could help to discriminate between AML and ALL. In this preliminary study, monocytes' conductivity allowed the PAL identification, but future research should be done.

© 2019 The Authors

IJLH © 2019 John Wiley & Sons Ltd, Int. Jnl. Lab. Hem. 2019 41 (Suppl. 2) 1-204

## 10.1.8. The value of Cell Population Data for screening and diagnosis of hereditary spherocytosis.

**Morales-indiano C**, Ancochea A, Nieto J, Martínez A, Tejedor X, Sala MA, Rodríguez I, Dueñas A, Jiménez O, Llopis MA. The value of Cell Population Data for screening and diagnosis of hereditary spherocytosis. *Int Jnl. Lab. Hem.* 2017 39 (Suppl. 2) 3-133: 79.

ISLH 2017 Abstract Proceedings 79

### THE VALUE OF CELL POPULATION DATA FOR SCREENING AND DIAGNOSIS OF HEREDITARY SPHEROCYTOSIS.

CRISTIAN MORALES-INDIANO<sup>1</sup>, AGUEDA ANCOCHEA<sup>2</sup>, JAVIER NIETO<sup>1</sup>, ALICIA MARTÍNEZ<sup>1</sup>, XAVIER TEJEDOR<sup>1</sup>, M<sup>Á</sup>NGELES SALA<sup>1</sup>, INÉS RODRÍGUEZ<sup>2</sup>, ANA DUEÑAS<sup>1</sup>, ORLANDO JIMÉNEZ<sup>1</sup>, M<sup>Á</sup>NTONIA LLOPIS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hospital Germans Trias i Pujol BADALONA, Spain, <sup>2</sup>Hematology Department. Institut Català d'Oncoematologia. Hospital Germans Trias i Pujol. BADALONA, Spain

**Introduction:** Hereditary spherocytosis (HS) is a familial hemolytic disorder associated with a variety of mutations that lead to defects in red blood cell (RBC) membrane proteins. It is characterized by the presence of spherocytes in the peripheral blood smear. Its differential diagnosis is mainly performed with other hemolytic anemias such as autoimmune (AIHA), thalassemias, membranopathies or enzymopathies, among others. Cell Population Data (CPD) are numerical data provided by the DxH-800 haematological analyzer that define different cell populations. CPDs are obtained by Beckman-Coulter AIM technology combining Volume (V), Conductivity (C) and light scatter in five angles (MALS (9-43°), UMALS (20-43°), LMALS (9-19°), LALS (5°) and AL2 (0°)) providing a mean (M) and standard deviation (SD) of each population cell. The aim of our study was to evaluate whether the CPDs can help in the screening and diagnosis of HS. **Methods:** We evaluated 20 reference subjects and 57 patients with reticulocytosis (reticulocyte count > 100.0x10<sup>9</sup>/L): 5 HS, 3 AIHA, 20 trait thalassemia (TT) and 9 responses to treatment of iron deficiency anemia (RI). The complete blood counts, red blood cell parameters, reticulocyte count and CPD of reticulocyte (RET) and erythrocyte (NoRET) population were evaluated and performed on the Unicel-DxH800 (Beckman Coulter, Miami, FL, USA). The M and SD of CPD were studied. ANOVA-test was applied to assess the statistical deviation between the averages of all groups. The diagnostic performance was investigated using Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis. P-values < 0.05 were considered significant in all comparisons. Data were analyzed with computerized statistical package SPSS (v.20.0). **Results:** Most parameters showed significant difference between different groups analyzed (table 1). The CPDs M-SL-NoRET (9-190), M-SU-NoRET (20-430) and M-SM-NoRET (9-430) of erythrocyte population and M-SA-RET (50) of reticulocyte had significantly lower values in HS than in the other groups (table 1). These CPDs had a good performance discriminatory (AUC>0.900) between HS and other reticulocytosis causes (table2). The M-SL-NoRET (20-430) light scatter was the best discriminatory single parameter to identify HS. A value less than 46.5 shows a sensitivity and specificity of 96.9% and 100%, respectively. **Conclusions:** The CPD parameters, especially the light scatter at medium-high angle (M-SU-NoRET, 20-43°), have a great discriminatory capacity in the detection of HS, being useful for differential diagnosis.

Table 1. Mean and standard deviation values of different parameters and CPD in the five groups

Parameter	N (n=20)	HS (n=5)	TT (n=20)	AIHA (n=3)	RI (n=9)	P
RBC (10 <sup>12</sup> /L)	4.49±0.4	4.75±0.7	3.49±0.5 <sup>*</sup>	3.21±0.5 <sup>*</sup>	4.81±0.6	<0.001
Hb (g/L)	14.91±1	14.51±0.9	13.71±2.2 <sup>*</sup>	9.82±2.1 <sup>*</sup>	13.1±2.8 <sup>*</sup>	<0.001
Ht% (%)	43.9±2.9	42.9±0.8	37.2±3.8	29.7±0.3 <sup>*</sup>	35.8±0.3	<0.001
MCV (fl)	92.3±2.4	89.8±0.7	82.9±2.0 <sup>*</sup>	95.9±18.7	78.1±6.7 <sup>*</sup>	<0.001
MCH (pg)	31.8±1.0	30.7±2.9	28.9±2.1 <sup>*</sup>	31.9±4.2	24.2±2.3 <sup>*</sup>	<0.001
MCHC (g/dL)	34.8±0.5	34.2±1.8	32.8±0.1 <sup>*</sup>	35.8±0.4	30.9±2.4 <sup>*</sup>	<0.001
RDW (%)	13.9±0.5	17.0±2.0	16.4±0.8	18.2±0.9	24.5±1.7 <sup>*</sup>	<0.001
RDW (SD)	42.9±1.2 <sup>*</sup>	53.8±0.8	38.0±1.6 <sup>*</sup>	58.5±3.7	62.3±12.8	<0.001
Reticulocyte count (10 <sup>9</sup> /L)	58.9±21.4 <sup>*</sup>	239.2±108.4	320.3±36.9 <sup>*</sup>	146.3±13.7	148.2±76.0 <sup>*</sup>	<0.001
Reticulocyte (%)	1.2±0.3 <sup>*</sup>	3.4±0.3	1.9±0.2 <sup>*</sup>	3.3±1.4 <sup>*</sup>	3.3±1.8 <sup>*</sup>	<0.001
M-SA-RET (%)	102.3±3.2 <sup>*</sup>	88.4±0.3	103.0±0.2 <sup>*</sup>	108.7±9.3 <sup>*</sup>	104.2±7.3 <sup>*</sup>	<0.001
M-SM-NoRET (%)	50.6±4.2 <sup>*</sup>	40.2±0.2	57.8±5.5 <sup>*</sup>	63.3±11.4 <sup>*</sup>	49.2±5.4 <sup>*</sup>	<0.001
M-SU-NoRET (%)	55.3±4.6 <sup>*</sup>	45.2±0.4	62.4±5.5 <sup>*</sup>	68.7±11.3 <sup>*</sup>	54.9±5.3 <sup>*</sup>	<0.001
M-SL-NoRET (%)	42.5±5.0 <sup>*</sup>	31.4±0.0	48.4±3.9 <sup>*</sup>	58.7±11.0 <sup>*</sup>	40.9±5.0 <sup>*</sup>	<0.001

<sup>\*</sup> significant difference (p<0.05) respect to HS.

Table 2. AUC of CPDs.

Formula	AUC	95% CI	P
M-SA-RET	0.922	0.777-1.000	<0.001
M-SM-NoRET	0.969	0.916-1.000	<0.001
M-SU-NoRET	0.981	0.940-1.000	<0.001
M-SL-NoRET	0.950	0.871-1.000	<0.001

## 10.1.9. Role of Cell Population Data in the Differential Diagnosis of Lymphocytosis.

Nieto J, **Morales-indiano C**, Tejedor X, Martínez A, Sala MA, Qayyum K, Ancochea A, Jiménez O,

Llopis MA. Role of Cell Population Data in the Differential Diagnosis of Lymphocytosis.

*Int Jnl. Lab. Hem. 2017 39 (Suppl. 2) 3-133: 85.*

ISLH 2017 Abstract Proceedings 85

### ROLE OF CELL POPULATION DATA IN THE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF LYMPHOCYTOSIS.

JAVIER NIETO<sup>1</sup>, CRISTIAN MORALES-INDIANO<sup>1</sup>, XAVIER TEJEDOR<sup>1</sup>, ALICIA MARTÍNEZ<sup>1</sup>, M<sup>ANGELS</sup> SALA<sup>1</sup>, KOMAL QAYYUM<sup>1</sup>, AGUEDA ANCOCHEA<sup>2</sup>, ORLANDO JIMÉNEZ<sup>1</sup>, M<sup>ANTONIA</sup> LLOPIS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Laboratori Unificat Metropolitana Nord (LUMN). Hospital Germans Trias i Pujol BADALONA, Spain. <sup>2</sup>Hematology Department, Institut Català d'Oncologia. Hospital Germans Trias i Pujol BADALONA, Spain*

**Introduction:** Chronic lymphocytic leukemia (CLL) and viral infections (VI), such as infectious mononucleosis (VIE) or Cytomegalovirus infection (CMV), are two important causes of lymphocytosis. Currently, hematology analyzers can report morphological changes of the counted cells. Beckman Coulter DxH800 analyzer provides morphological characteristics of different cells populations called Cell Population Data (CPD). AIM technology of DxH-800 provides mean (M) and standard deviation (SD) of Volume (V), Conductivity (C) and Light Scatter in five angles ((MALS(9-43°), UMALS(20-43°), LMALS(9-19°), LALS(5°) y AL2(0°)) of each leucocyte population. The aim was to compare the CPD of lymphocyte in order to discriminate the cause of lymphocytosis between CLL and VI on the Beckman Coulter DxH800. **Methods:** 59 patients with lymphocytosis (lymphocyte count > 5.0x10<sup>9</sup>/L) and 63 references subjects were evaluated. 41 patients were diagnosed of CLL and 18 of VI (12 VIE and 6 CMV). The complete blood counts and CPD were evaluated and performed on the Unicel-DxH800 (Beckman Coulter, Miami, USA). The M and SD of CPD were studied. Data was compared by one way-ANOVA with multiple comparison test (median± standard deviation). The diagnostic performance was investigated using Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis. *P-values*< 0.05 were considered significant in all comparisons. Data were analyzed with computerized statistical package SPSS(v.20.0). **Results:** One way-ANOVA test reported statistically significant differences of all CPD between 3 groups (*p*< 0.001). Patients with VI had lymphocytes with higher volume [M-V-Li (IV: 101.58±6.98 vs CLL: 83.92±10.35) and SD-V-Li (IV:23.70±3.50 vs CLL:18.83±6.20)] and higher size [M-AL2-Li (IV:79.9±8.69 vs CLL:70.87±7.83) and SD-AL2-Li (IV:15.42±2.96 vs CLL: 11.89±2.35)] than CLL patients (*p*< 0.001). Nuclear structure of lymphocyte population [M-SA-Li: (IV:38.53±6.56 vs CLL:28.38±4.97 and SD-SA-Li (IV:12.80±1.75 vs CLL:9.64±2.35)] were statistically different in all groups. CPD of volume and size (M-V-Li, SD-V-Li, M-AL2-Li, SD-AL2-Li) and nuclear structure (M-SA-Li, SD-SA-Li) had a good performance discriminatory (AUC>0.800) between VI and CLL. M-V-Li (AUC=0.924, *p*< 0.001) and M-SA-Li (AUC=0.904, *p*< 0.001) are the best discriminatory parameter to distinguish between VI from CLL with a sensitivity and specificity of 90%, 77% and 90%, 75%, respectively. **Conclusions:** The CPD parameters of V and light scatter at low angle SA (5°), that inform about volume and nuclear structure of lymphocytes, may help to differentiate between VI and CLL in patients with lymphocytosis initially.

## 10.1.10. The Role of Cell Population Data on Beckman Coulter DxH-800 in Differential diagnosis of iron deficiency anemia and thalassemia trait

**Morales-Indian C.**, Rodriguez-Hernández I., Jiménez Romero O., Serrando M., Tejedor X., Sala MA., Martínez A., Iglesias E., Dueñas A., Millà F., LLopis Díaz MA. The Role of Cell Population Data on Beckman Coulter DxH-800 in Differential diagnosis of iron deficiency anemia and thalassemia trait. *XXIXth International Symposium on Technological Innovations in Laboratory Hematology, ISLH 2016, 12-14 May 2016, Milano, Italy.*

*Int Jnl. Lab. Hem. 2016 38 (Suppl. 2) 1-119: 75.*

ISLH 2016 Abstracts 75

### THE ROLE OF CELL POPULATION DATA ON BECKMAN COULTER DXH-800 IN DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF IRON DEFICIENCY ANEMIA AND THALASSEMIA TRAIT

Cristian Morales-Indian<sup>1</sup>, Inés Rodriguez<sup>2</sup>, Orlando Jiménez<sup>3</sup>, Maite Serrando<sup>1</sup>, Xavier Tejedor<sup>1</sup>, Alicia Martínez<sup>1</sup>, Eva Iglesias<sup>1</sup>, Angels Sala<sup>1</sup>, Ana Dueñas<sup>1</sup>, Fuensanta Millà<sup>2</sup>, M<sup>4</sup> Antonia Llopis<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Laboratori Clínic Del Barcelonès Nord I Vallès Oriental. Hospital Germans Trias I Pujol. Badalona, Spain, <sup>2</sup>Hematology Department, Institut Català D'Oncoología. Hospital Germans Trias I Pujol. Badalona, Spain, <sup>3</sup>Clinical Laboratory. Hospital Universitari Josep Trueta. Girona, Spain

**Introduction:** The Cell Population Data (CPD) consists of a numerical data which report morphological characteristics of different cells population. The CPD are generated from AIM technology on DxH-800 (Beckman Coulter) using the Volume (V), Conductivity (C) and Light Scatter in five angles. The CPD provide a mean (M) and a standard deviation (SD) values for each cell population analyzed. The aim was to evaluate the CPD of reticulocyte (RET) and non-reticulocyte (NoRET) population on the Beckman Coulter DxH800 in distinguishing between iron deficiency anemia (IDA) and thalassemia trait (TT). **Methods:** A total of 379 subjects were studied (100 references subjects, 148 with IDA and 131 with TT). The complete blood counts (CBC) were performed on the Unicel DxH800 (Beckman Coulter, Miami, FL, USA). Red blood cell parameters, reticulocyte count and CPD of RET and NoRET population were evaluated. Were analyzed the mean(M) and standard deviation(SD) of CPD. ANOVA-test was applied to assess the statistical deviation between the averages of the three groups. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was utilized

combination formulas in the assessment of microcytic-hypochromic anemia. A *p* values < 0.05 were considered significant in all analysis. Data were analyzed with computerized statistical package SPSS (v.20.0). **Results:** The most parameters analyzed showed significant differences between groups. All CPD showed statistically significant differences between TT and IDA groups. Subjects with TT had higher Conductivity and lower Volume both RET and the NoRET population than IDA patients (*p*< 0.001). The conductivity (M and SD) both RET and NoRET population had a good performance discriminatory (AUC>0.900) between IDA and TT. The M-V-RET was the best discriminatory single parameter to distinguish between IDA from TT by ROC analysis (AUC=0.952) with a sensitivity and specificity of 90.5% and 83.1%, respectively. The formula [RBC x

(M-C-RET+SD-C-RET) x 1000]/(M-V-NoRET x ADE-SD x VCM) showed an AUC of 0.998 (IC95%: 0.995-1.000; *p*< 0.001). Subjects with IDA showed significantly lower values than subjects with TT to this formula. A value of 3.6 was the best cut-off for distinguishing TT of IDA, with a sensitivity and specificity of 97.4% and 98%, respectively. **Conclusions:** The CPD parameters of Volume and Conductivity defined the morphological characteristics of reticulocyte and non-reticulocyte population properly. The formula (RBC x [M-C-RET+SD-C-RET] x 1000) / [M-V-NoRET x ADE-SD x VCM]) could be useful in distinguishing thalassemia trait from iron deficiency anemia.