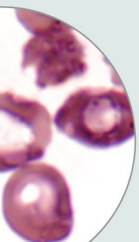
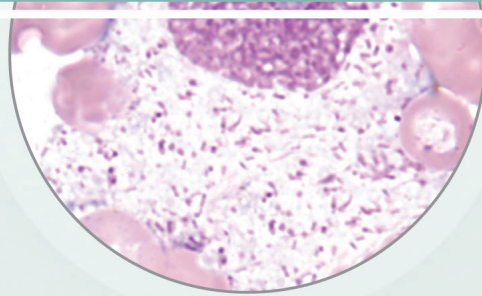
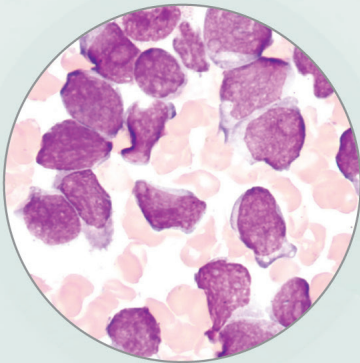


INTRODUCCIÓN AL EXAMEN DEL FROTIS DE SANGRE PERIFÉRICA



Un frotis de sangre preparado en forma adecuada es esencial para asegurar la evaluación correcta de la morfología celular. Se encuentra disponible una variedad de métodos para la preparación y la tinción de los frotis de sangre; a continuación se describen los más comunes. El estudio de otras metodologías supera el alcance de este atlas; sin embargo, las descripciones detalladas de esos procedimientos pueden hallarse en libros de texto de hematología, como *Hematología de Rodak: Principios y Aplicaciones Clínicas* de Kehoane, Smith y Walenga.

PREPARACIÓN DE UN FROTIS CON LA TÉCNICA DEL PORTAOBJETOS EN CUÑA

PREPARACIÓN DEL FROTIS DE SANGRE PERIFÉRICA

Si bien algunos analizadores automáticos preparan y tiñen los frotis de sangre según los criterios establecidos, en muchos lugares aún se utilizan las preparaciones manuales de frotis de sangre. La preparación de extendidos con la técnica del portaobjetos en cuña es una técnica conveniente y comúnmente utilizada para hacer los frotis de sangre periférica. Esta técnica requiere al menos dos portaobjetos de vidrio, limpios, de 75×25 mm. Se recomienda el empleo de portaobjetos para microscopía de alta calidad, con bordes biselados. Uno de los portaobjetos se utiliza como soporte del extendido sanguíneo y el otro, como portaobjetos extensor, los que luego pueden invertirse para preparar un segundo extendido. Una gota de sangre anticoagulada con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) de aproximadamente 3 mm de diámetro se coloca en un extremo del portaobjetos. Una alternativa aceptable es poner una gota de sangre de tamaño similar obtenida por punción de un dedo o del talón. El tamaño de la gota de sangre es importante. Las gotas demasiado grandes forman extendidos muy largos o gruesos, mientras que las que son demasiado pequeñas por lo general producen extendidos cortos o delgados. Al preparar el frotis, el portaobjetos extensor debe ser sostenido de manera segura por delante de la gota de sangre en un ángulo de 35-45 grados respecto del otro portaobjetos (**Fig. 1-1A**). El portaobjetos extensor se desliza hacia atrás hasta que toma contacto con la gota de sangre y se lo sostiene en esa posición hasta que la sangre se esparce por todo el ancho del portaobjetos (**Fig. 1-1B**). A continuación, el extensor se desliza con rapidez y suavidad hacia el otro extremo del portaobjetos que sirve de soporte del extendido, con lo que se crea un frotis en cuña (**Fig. 1-1C**). Es importante que se tome y se extienda toda la gota de sangre. El movimiento demasiado lento hacia delante del portaobjetos extensor acentúa la distribución incorrecta de los leucocitos debido a que empuja las células más grandes, por ejemplo, monocitos y granulocitos, hacia el final y los bordes del frotis. Es esencial mantener un ángulo constante entre los portaobjetos, y una presión suave y uniforme. Con frecuencia, es necesario ajustar el ángulo entre los portaobjetos para obtener un extendido satisfactorio. Para los hematocritos mayores que los normales, el ángulo entre los portaobjetos debe disminuirse para que el extendido no sea demasiado corto y grueso. En el caso de hematocritos extremadamente bajos, el ángulo entre los portaobjetos debe aumentarse. Un frotis de sangre periférica realizado en forma correcta (**Fig. 1-2**) presenta las siguientes características:

1. Alrededor de dos tercios a tres cuartos de la longitud total del portaobjetos está cubierta por el extendido.
2. Es ligeramente redondeado en su borde en pluma (porción más delgada), no en forma de bala.
3. Los bordes laterales del frotis deben ser visibles. La utilización de portaobjetos con esquinas biseladas puede facilitar esta apariencia.
4. Es liso, sin irregularidades, agujeros o rayas.
5. Cuando el portaobjetos se observa a la luz, el borde en pluma del frotis debe tener una apariencia en “arcoíris”.
6. Se toma y se extiende la gota completa.

La **Figura 1-3** muestra ejemplos de frotis inaceptables.

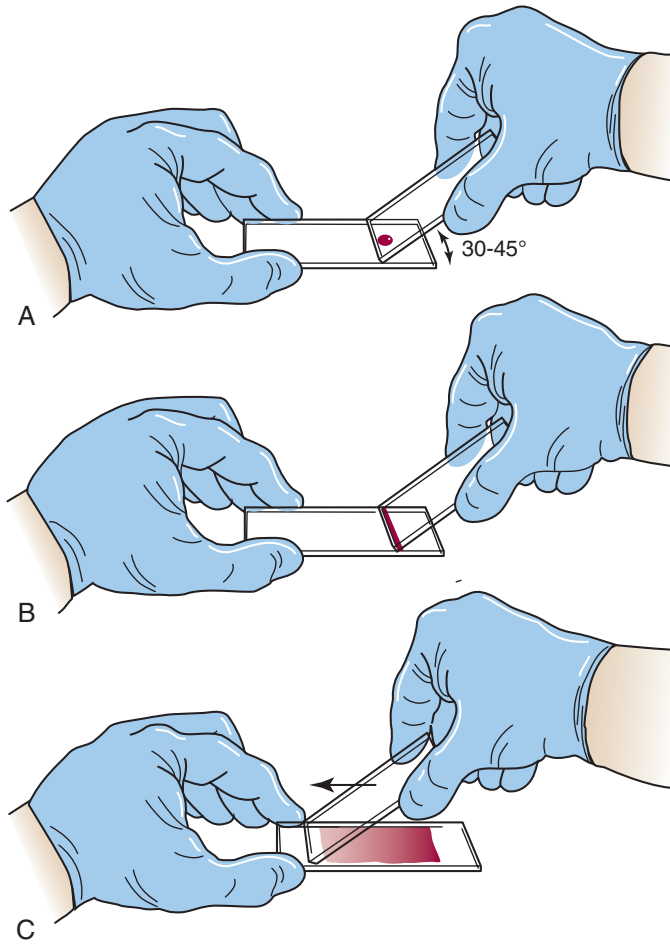
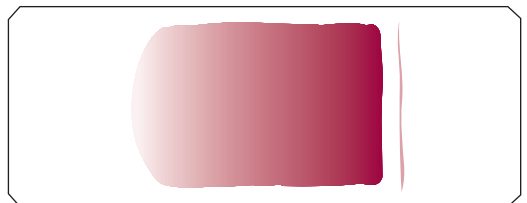


FIGURA 1-1 Técnica del portaobjetos en cuña para la preparación de un frotis de sangre periférica. **A.** Ángulo correcto para sujetar el portaobjetos extensor. **B.** Distribución de la sangre a lo ancho del portaobjetos. **C.** Terminación del frotis con la técnica del portaobjetos en cuña (De Keohane E.A., Smith L., Walenga J. [Eds.] [2016]. *Rodak's hematology: clinical principles and applications*. (5.ª ed.). St. Louis: Saunders Elsevier).

FIGURA 1-2 Frotis de sangre periférica bien realizado. (De Keohane E.A., Smith L., Walenga J. [Eds.] [2016]. *Rodak's hematology: clinical principles and applications*. (5.ª ed.). St. Louis: Saunders Elsevier).



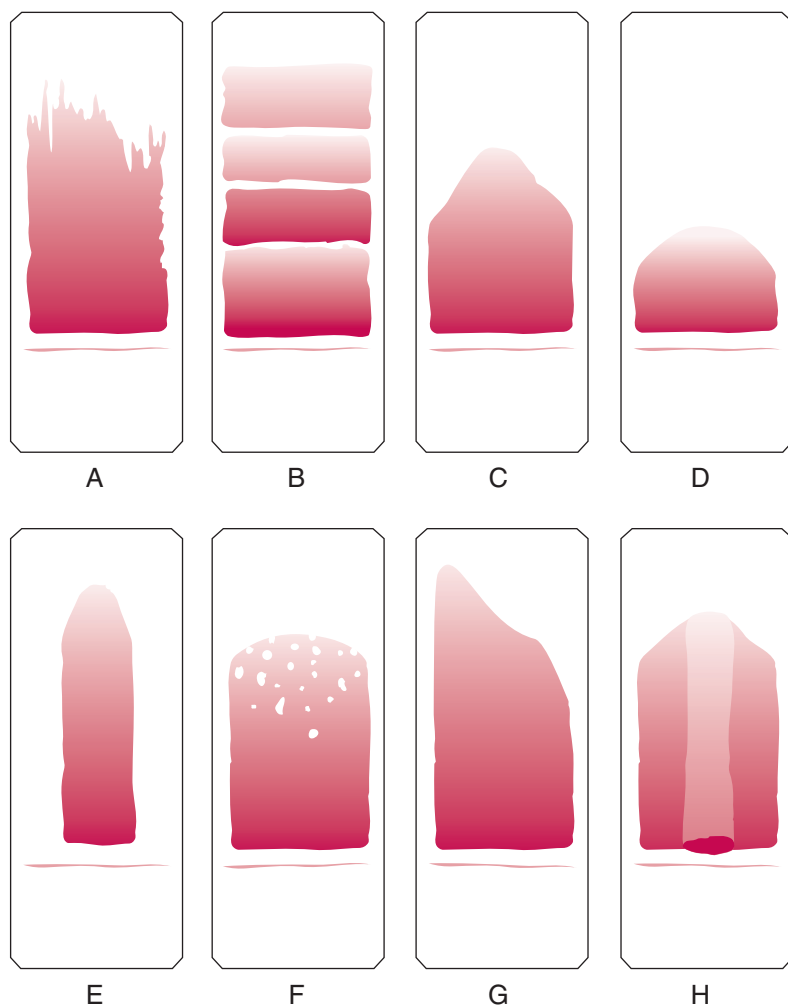


FIGURA 1-3 Frotis de sangre periférica inaceptables y causas. Se muestran los aspectos de los frotis asociados con los errores más comunes, pero nótese que puede haber causas combinadas para que el frotis sea inaceptable. **A.** Borde astillado o rugoso del portaobjetos extensor. **B.** Vacilación en el movimiento hacia adelante del portaobjetos extensor. **C.** El portaobjetos extensor es empujado con demasiada rapidez. **D.** La gota de sangre es demasiado pequeña. **E.** No se permitió que la sangre se distribuyera a lo ancho del portaobjeto antes de que el extendido se realice. **F.** Suciedad o grasa sobre el portaobjetos; también puede ser causado por aumento de los lípidos en la muestra de sangre. **G.** Presión despareja sobre los lados del portaobjetos extensor. **H.** Demora en la realización del frotis; la sangre comenzó a secarse. (De Keoghane E.A., Smith L., Walenga J. [Eds.] [2016]. *Rodak's hematology: clinical principles and applications*. (5.ª ed.). St. Louis: Saunders Elsevier).

TINCIÓN DEL FROTIS DE SANGRE PERIFÉRICA

El propósito de teñir los frotis sanguíneos es identificar las células y reconocer con facilidad la morfología a través del microscopio. Las tinciones de Wright o de Wright-Giemsa son las utilizadas con mayor frecuencia para frotis de sangre periférica o médula ósea. Ambas contienen eosina y azul de metileno; por lo tanto, se denominan *tinciones policrómicas*.

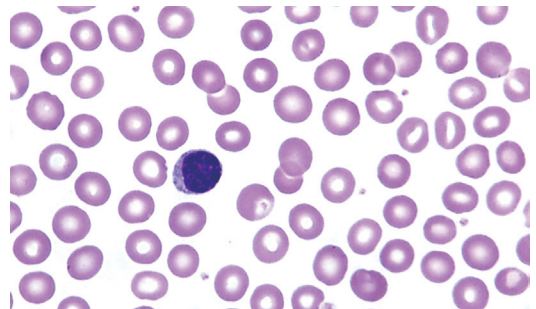
Los frotis deben dejarse secar por completo antes de teñirse. Las células se fijan sobre el portaobjetos de vidrio con el metanol de la tinción. Las reacciones de tinción dependen del pH; la tinción real de los componentes celulares sucede cuando se agrega una solución amortiguadora (pH 6,4) a la tinción. El azul de metileno libre es básico y tiñe de azul los componentes celulares ácidos, como por ejemplo el RNA. La eosina libre es ácida y tiñe de rojo los componentes básicos, como la hemoglobina o los gránulos eosinófilos. Los neutrófilos poseen gránulos citoplasmáticos que tienen pH neutro y admiten algunas características de ambas tinciones. Los detalles de los métodos específicos de tinción de frotis de sangre periférica o médula ósea, incluidos los métodos automatizados, pueden hallarse en un libro de texto de hematología.

Un frotis teñido de manera adecuada (**Fig. 1-4**) tiene las siguientes características:

1. Los eritrocitos deben ser de color rosa a salmón.
2. Los núcleos son de color azul oscuro a violeta.
3. Los gránulos citoplasmáticos de los neutrófilos son de color lila.
4. Los gránulos citoplasmáticos de los basófilos son de color azul oscuro a negro.
5. Los gránulos citoplasmáticos de los eosinófilos son de color rojo a anaranjado.
6. El área entre las células debe ser incolora, estar limpia y libre de precipitados de colorante.

Es necesario contar con un extendido bien teñido para lograr una interpretación exacta de la morfología celular. Los mejores resultados de la tinción se obtienen a partir de frotis recientemente preparados en un período de 2 a 3 horas de recolectada la sangre. Las razones más frecuentes de una tinción defectuosa de frotis se enumeran en el **Recuadro 1-1**, por lo que este puede ser utilizado como guía de solución de problemas.

FIGURA 1-4 Frotis de sangre periférica teñido de modo óptimo que demuestra el área apropiada en la cual realizar la determinación del recuento diferencial, la morfología de los leucocitos y la estimación del número de plaquetas. Se muestra solo el centro del campo; un campo completo contendría entre 200 y 250 eritrocitos (original 1 000×).



RECUADRO 1-1**Solución de problemas para los frotis de sangre teñidos en forma defectuosa****Primera situación****Problemas**

- Los eritrocitos aparecen de color gris
- Los leucocitos están demasiado oscuros
- Los gránulos de los eosinófilos son de color gris, no anaranjados

Causas

- El colorante o la sustancia amortiguadora están demasiado alcalinos (lo más común)
- Lavado inadecuado
- Tinción prolongada
- Muestra de sangre heparinizada

Segunda situación**Problemas**

- Los eritrocitos están demasiado pálidos o de color rojo
- Los leucocitos son apenas visibles

Causas

- El colorante, la sustancia amortiguadora o ambos están demasiado ácidos (lo más común)
- Pérdida de capacidad amortiguadora (tiempo demasiado breve)
- Exceso de lavado

De Keohane E.A., Smith L., Walenga J. (Eds.) (2016) *Rodak's hematology: clinical principles and applications*. (5.ª ed). St. Louis: Saunders Elsevier.

EXAMEN DEL FROTIS DE SANGRE PERIFÉRICA

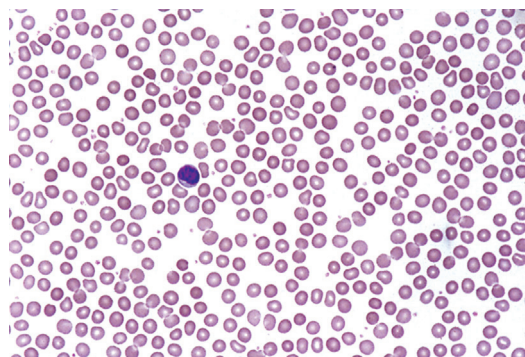
EXAMEN CON OBJETIVO 10×

El examen del frotis sanguíneo es un proceso de varios pasos. Se comienza con el análisis del frotis con un barrido del portaobjetos con el objetivo 10× o de bajo aumento (aumento total = 100×). Este paso es necesario para determinar la calidad general del frotis, incluida la distribución anormal de los eritrocitos que sugiere la presencia de *rouleaux* (pila de monedas) o autoaglutinación con la presencia o no de un número desproporcionado de grandes células nucleadas (p. ej., monocitos o neutrófilos) en los bordes del extendido. Si esto último sucede, debe prepararse otro frotis. Además, el examen del frotis con objetivo 10× permite la rápida detección de grandes células anormales, como blastos, linfocitos reactivos y parásitos.

EXAMEN CON OBJETIVO 40× O 50×

Con el empleo del objetivo 40× (gran aumento seco, seco fuerte) o el objetivo de inmersión en aceite 50× (o sea, aumento total 400× o 500×, respectivamente), se busca un área del frotis en la cual los eritrocitos se encuentren uniformemente distribuidos y donde apenas se toquen unos con otros (dos o tres células pueden superponerse; **Fig. 1-5**). Se examinan 8 a 10 campos en esta área del frotis y se determina el número promedio de leucocitos por campo. Aunque el factor exacto varía con la marca y el modelo

FIGURA 1-5 Área correcta del frotis de sangre para evaluar la distribución celular y realizar la estimación de los leucocitos (400×).

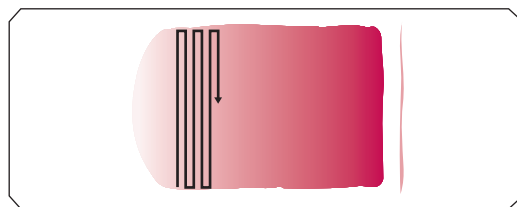


del microscopio, en general un recuento aproximado de leucocitos por milímetro cúbico puede determinarse al multiplicar el número promedio de leucocitos por campo de gran aumento por 2000 (si se utiliza 40×) o 2500 (si se utiliza 50×). Este estimado es una herramienta de control de calidad útil para validar los recuentos de leucocitos realizados por los analizadores hematológicos. Debe resolverse cualquier discrepancia entre el recuento de leucocitos del instrumento y el estimado por el frotis. Algunas razones de esta discrepancia pueden ser la presencia de grumos de leucocitos, o de plaquetas, hebras de fibrina, aglutinación intensa de eritrocitos, crioprecipitados y plaquetas gigantes, además de un frotis mal rotulado, uno realizado a partir de la muestra incorrecta del paciente y un mal funcionamiento del analizador hematológico.

EXAMEN CON OBJETIVO 100×

El paso siguiente en la evaluación del frotis es realizar el recuento diferencial de leucocitos. Esto se efectúa en la misma área del frotis en la que se hizo el estimado del recuento de leucocitos, pero utilizando el objetivo de inmersión en aceite 100× (aumento total 1000×). Cuando se analiza el área correcta de un frotis de un paciente con recuento normal de eritrocitos, se observan alrededor de 200 a 250 eritrocitos por campo de inmersión en aceite (véase **Fig. 1-4**). Por lo general, el recuento diferencial incluye el conteo y la clasificación de 100 leucocitos consecutivos y el informe de estas clases como porcentajes. El recuento diferencial se realiza de modo sistemático; para ello, se utiliza un recorrido en patrón de guarda griega (**Fig. 1-6**), el cual minimiza los errores de distribución de los leucocitos. Los resultados se informan como porcentajes de cada tipo de leucocito observado durante el recuento. Un ejemplo de recuento diferencial de leucocitos es el siguiente: 3% de neutrófilos en banda, 55% de neutrófilos polimorfonucleares, 30% de linfocitos, 6% de monocitos, 4% de eosinófilos y 2% de basófilos (**Cuadro 1-1**). Se informa también cualquier alteración de los leucocitos que se observe; por ejemplo, cambios tóxicos, cuerpos de Döhle, linfocitos reactivos y bastones de Aüer. Cuando se encuentran presentes, los eritrocitos nucleados se cuentan e informan como número de eritrocitos nucleados por 100 leucocitos. La evaluación

FIGURA 1-6 Patrón en guarda griega, serpentina o "almena" para realizar el recuento diferencial de leucocitos. (De Keohane E.A., Smith L., Walenga J. [Eds.] [2016]. *Rodak's hematology: clinical principles and applications*. (5.ª ed.). St. Louis: Saunders Elsevier).

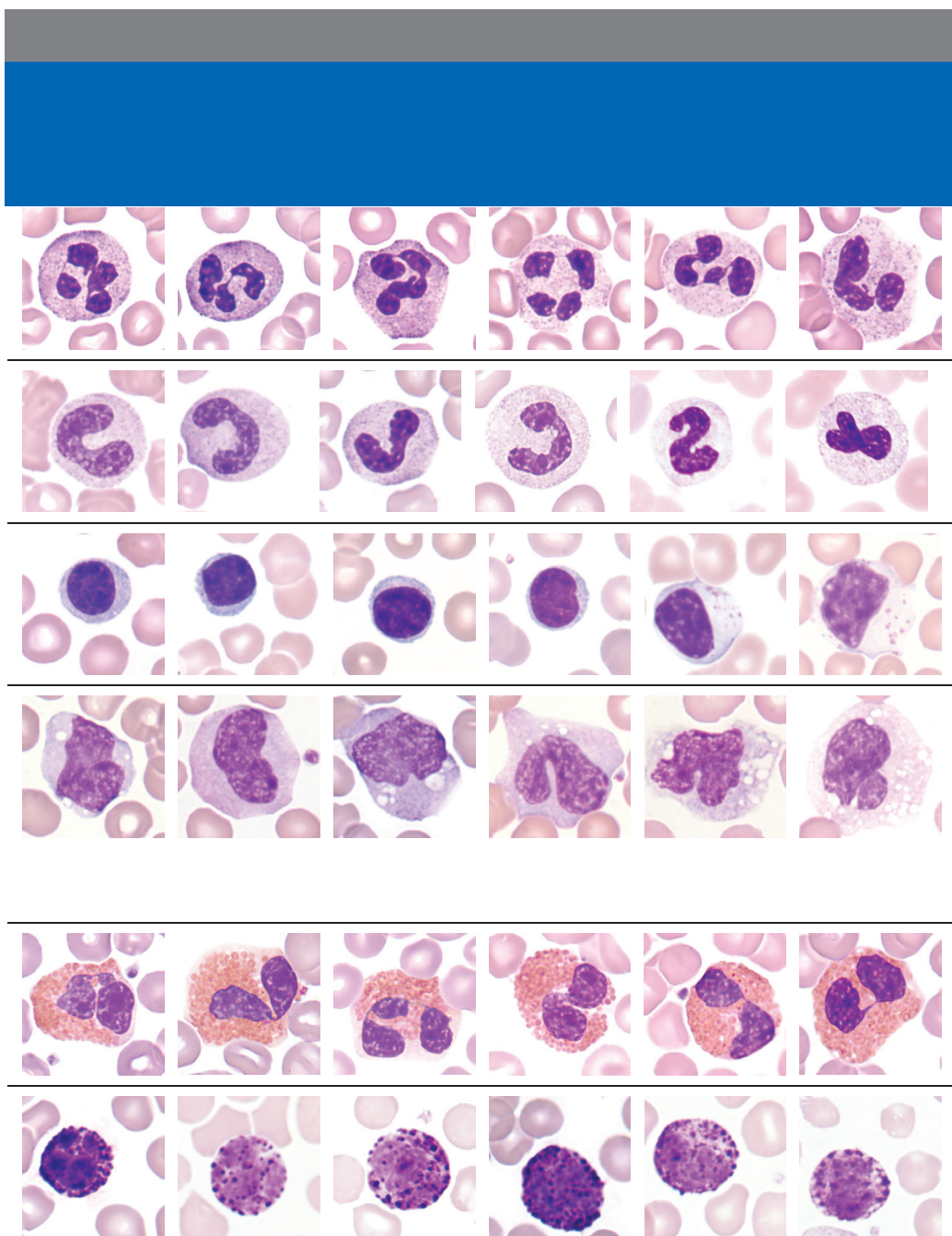


CUADRO 1-1

Células halladas en un recuento diferencial normal de leucocitos							
Tipo celular	Tamaño celular (μm)	Núcleo	Cromatina	Citoplasma	Gránulos	Rango de referencia en el adulto (sangre periférica) (%)	Rango de referencia en el adulto (células × 10 ⁹ /L)
Neutrófilos segmentados (Seg), neutrófilos polimorfonucleares (PMN)	10 a 15	2 a 5 lóbulos conectados por filamentos delgados sin cromatina visible	Grumos gruesos	Azul pálido a rosa	1.º: inusuales 2.º: abundantes	50 a 70	2,3 a 8,1
Neutrófilos en banda (Banda)	10 a 15	Estrechado, pero la cromatina debe ser visible dentro de la parte más delgada	Grumos gruesos	Azul pálido a rosa	1.º: escasos 2.º: abundantes	0 a 5	0 a 0,6
Linfocitos (Linf)	7 a 18*	Redondo a oval; puede ser ligeramente dentado; en ocasiones, se observa el nucléolo	Condensada a intensamente condensada	Escaso a moderado; celeste cielo; puede presentar vacuolas	± Escasos azurófilos	20 a 40	0,8 a 4,8
Monocitos (Mono)	12 a 20	Variable; puede ser redondo, en herradura o en forma de riñón. A menudo, tiene pliegues que producen circunvoluciones similares a las del cerebro	Simil encaje	Gris azulado; puede tener pseudópodos; las vacuolas pueden estar ausentes o ser numerosas	Muchos gránulos finos, con frecuencia dan un aspecto de vidrio esmerilado	3 a 11	0,5 a 1,3
Eosinófilos (Eos)	12 a 17	2 a 3 lóbulos conectados por filamentos delgados sin cromatina visible	Grumos gruesos	Crema a rosa; puede presentar bordes irregulares	1.º: inusuales 2.º: abundantes rojos a anaranjados, redondos	0 a 5	0 a 0,4
Basófilos (Baso)	10 a 14	En general, 2 lóbulos conectados por filamentos delgados sin cromatina visible	Grumos gruesos	Color lavanda a incoloro	1.º: inusuales 2.º: variable en número, con distribución irregular; pueden ocultar el núcleo o desprenderse durante la tinción, que da el aspecto de áreas vacías en el citoplasma	0 a 1	0 a 0,1

* La diferencia de tamaño entre el linfocito pequeño y el grande se debe principalmente a la mayor cantidad de citoplasma. Véase **Capítulo 9** para la información más detallada sobre el tamaño de linfocitos.

1º, primario; 2º, secundario.



de la morfología de los eritrocitos, los leucocitos y las plaquetas y el recuento estimativo de plaquetas se realiza también utilizando el objetivo de inmersión en aceite 100×. Las inclusiones de eritrocitos (p. ej., los cuerpos de Howell-Jolly) y las inclusiones de leucocitos (como los cuerpos de Döhle) pueden observarse también con este aumento. Cada laboratorio debe establecer protocolos para estandarizar el informe de estas alteraciones.

La evaluación de la morfología de los leucocitos es un aspecto importante del análisis del frotis; se utiliza en conjunto con los índices hematimétricos para describir si las células por tamaño, forma y color son normales o anómalas. La mayoría de los laboratorios emplean enunciados concisos que describen la morfología global de los eritrocitos, que es coincidente con los índices hematimétricos. La evaluación microscópica de la morfología de los eritrocitos debe ser congruente con la información suministrada por el analizador hematológico automatizado. De lo contrario, las discrepancias deben resolverse antes de informar los resultados al paciente.

El paso final del recuento diferencial es la estimación del número de plaquetas, en la que se utiliza el objetivo de inmersión en aceite 100×. Se realiza el recuento del número de plaquetas en 10 campos que correspondan a un área del frotis donde los eritrocitos apenas se toquen. El número promedio de plaquetas se multiplica por 20 000 para obtener un número estimativo del total de plaquetas presente en la muestra. Este número estimativo se considera adecuado si coincide con el recuento normal de plaquetas; disminuido, si se encuentra por debajo del límite inferior normal para ese laboratorio; y aumentado, si se encuentra por encima de este límite. Un rango de referencia general es 150 000 a 450 000/mm³ (150 a 450 × 10⁹/L). El número estimativo puede compararse con un recuento de plaquetas automatizado como una medida de control de calidad adicional.

Como una medición adicional del control de calidad, el valor estimado puede compararse con el recuento de plaquetas obtenido en el contador automatizado. Si el recuento de plaquetas estimado y el obtenido en el instrumento no coinciden, deben resolverse las discrepancias. Algunas de ellas pueden deberse a la presencia de células gigantes, muchos esquistocitos (fragmentos de eritrocitos) y satelitismo plaquetario. Debe mencionarse que los técnicos experimentados pueden utilizar los objetivos de inmersión en aceite 40× y 50× de alta calidad para realizar el análisis diferencial del frotis sanguíneo. Sin embargo, todos los hallazgos anómalos deben verificarse con el objetivo 100×.

RESUMEN

Es posible obtener una cantidad considerable de información valiosa a partir de una adecuada preparación, tinción y evaluación del frotis de sangre periférica. La mayoría de los laboratorios utilizan frotis realizados por la técnica del portaobjetos en cuña a partir de sangre anticoagulada con EDTA y teñidos con la coloración de Wright o Wright-Giemsa. Los frotis deben ser analizados en el microscopio de manera sistemática empleando primero el objetivo 10×, luego el objetivo de gran aumento seco 40× o el objetivo en aceite 50× y, por último, el objetivo de inmersión en aceite 100×. La morfología y el recuento diferencial de los leucocitos, la morfología de los eritrocitos y el número estimativo de plaquetas se encuentran incluidos en la evaluación del frotis.