



Universidad Nacional
Del Nordeste

Práctica Electiva

“Observación de serie roja en
frotis periférico en pacientes
de cuidados intensivos”

Hospital Escuela Gral. José
Francisco de San Martín.

Alumno: Teixeira Pinto, Milton Nery

Directora: Ivan, María Victoria. Especialista en
Bioquímica Clínica-Área Hematología Clínica.



OBJETIVOS GENERALES

- Brindar al alumno que está finalizando el Ciclo de Formación Profesional, un espacio curricular que le permita profundizar su capacitación en el campo disciplinar de la Hematología Clínica.
- Posibilitar un mayor desarrollo de competencias en aspectos no tradicionales del perfil profesional y que presentan una importante demanda en Investigación Básica e Investigación Aplicada en el área de Hematología Clínica.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Conocer las alteraciones morfológicas en el frotis de sangre periférica en pacientes de UTI.
- Desarrollar la técnica de Tinción de May-Grünwald-Giemsa.
- Relacionar los resultados obtenidos con la información clínica y bibliográfica.
- Aplicar procedimientos de control de calidad y de bioseguridad en el laboratorio de Hematología Clínica.
- Adquirir conductas adecuadas y habilidades que le permitan desempeñarse en el ámbito profesional en el futuro.

INTRODUCCIÓN

El estudio morfológico de la sangre periférica es una prueba de gran valor diagnóstico ya que a pesar del uso cada vez más extendido de equipos automatizados en hematología, estos nunca podrán sustituir a la apreciación citomorfológica realizada por un profesional preparado para esta tarea. El frotis de sangre periférica (FSP) es utilizado para la validación de los métodos automatizados. (1)

Es un examen sencillo, poco costoso y rápido en el informe de sus resultados, pero, por otro lado, requiere de mucho cuidado y experiencia. Esto está dado por el tiempo e interés que se le dedique a su aprendizaje, los cuidados en la toma de muestra, calidad de la extensión, su correcta tinción, observación e interpretación.

La descripción del FSP tiene como objetivo orientar al médico hacia el posible diagnóstico, evolución y pronóstico. Varias de las alteraciones morfológicas de los elementos formes de la sangre son traducción de un conjunto de enfermedades en general, pero otros, en cambio, tienen cierta especificidad en el diagnóstico (como sucede en algunas anemias hemolíticas, leucemias, en las enfermedades infecciosas virales y bacterianas). (2)

Las variaciones morfológicas de los hematíes pueden ser de tamaño (anisocitosis), de forma (poiquilocitosis), de coloración (cromía). Además, pueden presentar diferentes inclusiones intraeritrocitarias (Cuerpos de Heinz, Cuerpos de Howell Jolly, punteado basófilo) y parásitos como el plasmodio y la babesia.

Para determinar con mejor precisión los cambios en la morfología de las células de la sangre, la tinción debe realizarse con los colorantes May-Grünwald Giemsa (MGG).

El frotis de sangre periférica tiene también la ventaja de que puede guardarse y ser examinado tantas veces como sea necesario. Además, puede ser digitalizado y almacenado en formato electrónico para fines diagnósticos y educacionales, con la ventaja de que no requiere espacio.



En este trabajo se realizó el análisis retrospectivo de la serie roja en el extendido de sangre periférica de pacientes internados en una Unidad de Terapia Intensiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

POBLACION EN ESTUDIO

Fueron estudiados en forma retrospectiva y descriptiva los hemogramas y pacientes que estuvieron internados en el período comprendido desde junio a diciembre del 2018 en la Unidad de Terapia Intensiva (UTI) del Hospital Escuela Gral. de San Martín, Corrientes Capital.

MUESTRA

Las muestras se extrajeron por la mañana entre las 7:00 y 8:00 am, se realizaron al menos dos frotis de punta de jeringa en cada paciente, correctamente rotulados y se usó EDTA como anticoagulante para realizar el hemograma automatizado. En el transcurso de la mañana, luego de pasada la muestra por el contador hematológico CELL-DYN Emerald 3 Diff, se observaron los frotis teñidos con MGG para luego informar los resultados obtenidos.

Aunque desde el punto de vista técnico la realización de una extensión de sangre es muy simple, conseguir que no sea excesivamente gruesa ni excesivamente fina requiere práctica. Es primordial resaltar que, en cualquier caso, la calidad de la extensión es decisiva para poder apreciar la morfología eritrocitaria, leucocitaria y de plaquetas. Debe tenerse en cuenta que no todos los anticoagulantes deben ser utilizados, la heparina, por ejemplo, no debe emplearse como anticoagulante para la tinción de células sanguíneas porque favorece la agregación de las plaquetas y con ello la apreciación de su morfología o de su concentración a partir de la extensión. Además, la heparina también favorece la aparición de un refuerzo de la tonalidad azul de las tinciones cuando se emplea la coloración panóptica. (1)

En todas las etapas desde la obtención de la muestra hasta el informe de los resultados se tuvieron en cuenta las normas de bioseguridad: uso de guantes de látex descartables, alcohol 70%, jeringas y agujas 21G descartables, descartador de agujas, etc.

TÉCNICA DE COLORACIÓN DE MGG

La tinción de MGG es una técnica derivada del método de Romanowsky que se utiliza principalmente para la coloración de frotis sanguíneos o extendidos de médula ósea. Como el resto de las coloraciones basadas en ella, la técnica MGG permite diferenciar cualitativa y cuantitativamente los principales elementos formes de la sangre. Su uso es recomendado en Programas de Evaluación Externa de Calidad (PEEC), ha sido estandarizada por el External Quality Assurance Programmes in Laboratory Medicine (EQALM). (1)

La solución de May Grünwald contiene eosina (como colorante aniónico) y azul de metileno (como colorante catiónico) disueltos en metanol. La solución de Giemsa contiene eosina, azul de metileno y productos de la oxidación del azul de metileno (azur A, azur B, violeta de metilo y azul de metilo). Este tipo de coloración es muy sensible a la variación de pH, de manera que las estructuras celulares con carácter básico fijan los colorantes ácidos (eosina), mientras que las que poseen carácter ácido fijan los colorantes básicos (azul de metileno). Esto explica por qué ciertas estructuras basófilas presentes en el núcleo (nucleolo) o en el citoplasma (ribosomas) se colorean de azul, mientras que otros componentes acidófilos como la hemoglobina adquieran un color rosado. Además, La diferente afinidad de las granulaciones citoplasmáticas específicas de los polimorfonucleares (PMN) permite clasificarlos en tres grandes grupos:



- Granulocitos neutrófilos, en los que la granulación específica posee compuestos neutros que fijan ambos colorantes simultáneamente. El color resultante es pardo y a las granulaciones se las denomina neutrófilas.
- Granulocitos eosinófilos, en los que la granulación específica contiene sustancias de intenso carácter básico (espermina y derivados), que fijan fundamentalmente los colorantes ácidos (compuestos acidófilos). El color resultante es rojo-naranja.
- Granulocitos basófilos, en los que la granulación específica posee sustancias de fuerte carácter ácido (heparina, principalmente), que fijan los colores básicos como el azul de metileno (compuestos basófilos). El color resultante es azul oscuro.

El azur B tiñe de color púrpura la granulación primaria de los neutrófilos, la fina granulación de los monocitos y la que puede observarse en ciertos linfocitos de gran tamaño y abundante citoplasma (linfocitos grandes granulados). Asimismo, dicho colorante tiñe las inclusiones intraeritrocitarias previamente mencionadas. (1)

El proceso de coloreado consta de los siguientes pasos:

1. Comprobar que el extendido haya sido realizado correctamente, se encuentre seco y rotulado. Una buena extensión no debe ser excesivamente gruesa ni fina, ya que, en el primer caso, dificulta la observación de la morfología eritrocitaria y la distinción entre linfocitos y monocitos, además se puede perder parte del extendido luego de la coloración. Por otra parte, si es muy delgada, la mayoría de neutrófilos y monocitos se hallarán en las áreas periféricas. (1)
2. Colocar la solución de May Grünwald cubriendo todo el preparado y dejar actuar durante 5 minutos. Cuidando de que el colorante no se seque ya que se generan precipitados que interfieren en la correcta visualización del extendido en el microscopio.
3. Lavar con abundante agua estabilizada (agua destilada con pH de 7) eliminando toda la solución anterior.
4. Inmediatamente colocar la dilución 1/10 del colorante Giemsa, recién preparada, sobre el extendido. Dejar actuar la solución durante 15 minutos.
5. Lavar con abundante agua removiendo el colorante remanente y luego dejar secar al aire en posición vertical.

OBSERVACIONES

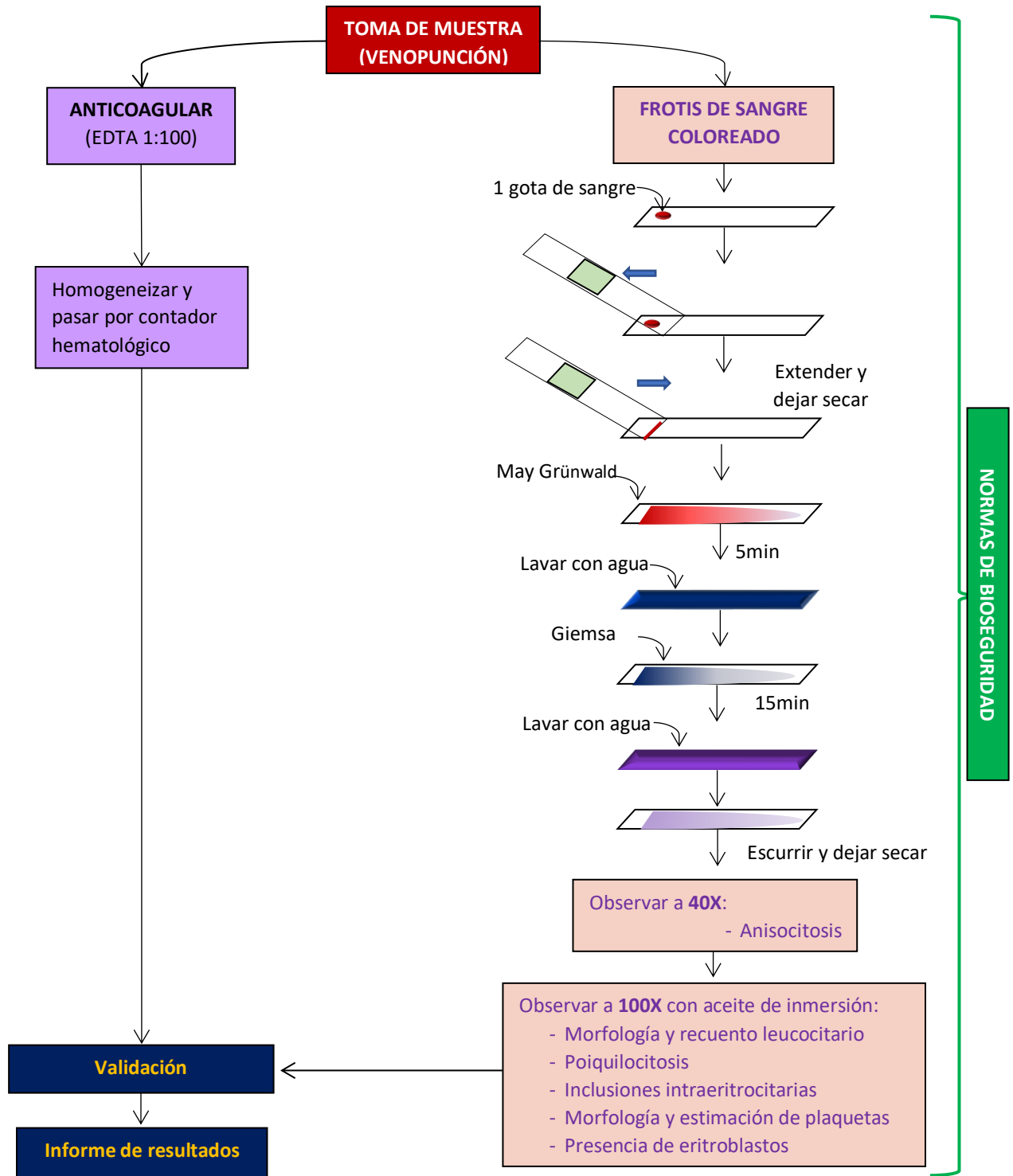
Los tiempos varían de acuerdo a cada lote o tiempo de maduración del colorante. De ahí que si los frotis recién teñidos resultan demasiado pálidos se corrige aumentando el tiempo de tinción o disminuyendo el tiempo de lavado.

Si en la preparación se observa precipitados de colorante puede ser debido a varias causas: lavado insuficiente al final del proceso, utilización de porta o cubreobjetos sucios, mala filtración del colorante, mala distribución del colorante a lo largo de la extensión por no mantenerse en posición horizontal, menor cantidad de solvente en la botella que se pierde por volatilización.

Durante la tinción el tampón fosfato controla el pH del colorante. Si el colorante es demasiado ácido la extensión resultará demasiado rojiza y si por el contrario es demasiado alcalina la precipitación presentará un aspecto azulado.



ESQUEMA DE TRABAJO





RESULTADOS

En un total de 460 muestras, se realizó el estudio de las alteraciones en la serie eritrocitaria. En la **Tabla 1** se detallan la cantidad de muestras que presentaron dichas alteraciones. Se tuvo en cuenta, por un lado, aquellas que detectó el contador hematológico y por otro, las observadas directamente en el FSP.

ALTERACIONES	C. H.	%	FSP	%
Anisocitosis (RDW>14%)	125	27,2	125	27,2
Hipocromía (Hb<28pg)	27	5,9	27	5,9
Microcitosis (VCM<85fL)	8	1,7	2	0,4
Macrocitosis (VCM>95fL)	210	45,7	3	0,7
Punteado basófilo	-	-	5	1,1
C. de Howell Jolly	-	-	1	0,2
Policromatofilia	-	-	15	3,3

Tabla 1. Alteraciones de la serie roja. Frecuencia y porcentaje.

C. H.: Contador Hematológico 3 DIFF. FSP: Frotis de Sangre Periférica

Se pudo determinar que la alteración más frecuente detectada por el contador hematológico fue la macrocitosis (VCM>95fL), en un 45,7% de las muestras. En cambio, en la visualización directa del FSP, fue la anisocitosis en un 27,2%. Cabe señalar que tanto las inclusiones intraeritrocitarias (Punteado basófilo, C. de Howell Jolly) como la policromatofilia no pueden detectarse en un contador hematológico 3DIFF, por lo cual cobra aún mayor importancia la observación de estas alteraciones en FSP.

Además, se estudió la presencia de eritrocitos inmaduros nucleados (eritroblastos: EB) ya que su presencia en sangre periférica es tomada como marcador de mal pronóstico en pacientes internados en cuidados intensivos (3) (4) (5) (6). Se detectaron 18 muestras con EB, que corresponde a un 3,9% del total (**Tabla 2**).

	Frecuencia	%
Eritroblastos	18	3.9

Tabla 2. Presencia de eritroblastos en sangre periférica

Al poseer núcleo y no ser destruidos por el lisante, se cuentan como leucocitos, pudiendo falsear su recuento; por ello se ha de aplicar un factor de corrección. Para esto se examina la extensión de sangre, se calcula el número de EB por cada 100 leucocitos (N° de EB) y se aplica la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{Eritroblastos}}{\mu\text{L}} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de EB}}{\text{N}^\circ \text{ de EB} + 100} \times \text{leucocitos}/\mu\text{L}$$

$$\text{Leucocitos corregidos} = \text{leucocitos}/\mu\text{L} - \text{eritroblastos}/\mu\text{L}$$

(1)



En este sentido se observó un 6% de EB en el FSP de una de las muestras, la misma arrojó 24.400 leucocitos/ μL por contador hematológico. Al realizar la corrección los valores obtenidos fueron:

$$\frac{\text{Eritroblastos}}{\mu\text{L}} = \frac{6}{6 + 100} \times \frac{24.400}{\mu\text{L}} = 1.381/\mu\text{L}$$

$$\text{Leucocitos corregidos} = \frac{24.400}{\mu\text{L}} - \frac{1381}{\mu\text{L}} = 23.019/\mu\text{L}$$

Por otro lado, se clasificó a la población estudiada según los valores de Hb en cuatro grupos (**Tabla 3**). Se pudo determinar que existe una mayor proporción (60%) de muestras con anemia moderada, valores de Hb entre 7-10 g/dL.

ANEMIA	Frecuencia	%
Normal (Hb>12)	55	12.0
leve (10<Hb<12g/dL)	109	23.7
moderada (7<Hb<10g/dL)	276	60.0
grave (<7g/dL)	20	4.3
Total	460	100.0

Tabla 3. Valores de Hb y grados de anemia.

Además, si tenemos en cuenta el total de los pacientes con anemia independiente de su gravedad, se pudo observar que el 88% de las muestras presentaron anemia.

DISCUSIÓN

Entre los cuadros clínicos que se observan en pacientes en una UTI se encuentran: los accidentes cerebrovasculares, las complicaciones de cirugías, la neumonía, los ataques cardíacos, los traumatismos importantes como los que ocurren por accidentes de tránsito, las caídas desde alturas, las quemaduras extensas, las heridas por armas de fuego, los accidentes industriales, los episodios de violencia y envenenamientos. (3)

Se define a la anemia como un nivel de hemoglobina (Hb) <13 g/dL en hombres y <12 g/dL en mujeres (4). Aproximadamente el 29% de los pacientes internados en UTI tiene una Hb<10 g/dL. Además, los pacientes en UTI constituyen una población con una elevada prevalencia de anemia (40-70%) (5), valores menores a los obtenidos en la población en estudio (88%).

La etiología de la anemia es multifactorial y compleja: sangrado gastrointestinal (factores de riesgo: ventilación mecánica, insuficiencia nutricional, insuficiencia renal aguda, anticoagulantes) procedimientos quirúrgicos, coagulopatías, hemólisis, hipoadrenalismo, flebotomías repetidas (promedio de 61 a 70 ml/día). Se comprobó que el volumen de sangre extraído en pacientes de UTI fue más del triple del volumen extraído en pacientes internados en sala común. Otros estudios señalan que pacientes con valores normales de Hb cuando fueron



admitidos, pero que luego desarrollaron anemia dentro del hospital tuvieron mayor probabilidad de empeorar su cuadro clínico. Esta anemia puede ocurrir como resultado de los procesos durante la hospitalización, como la hemodilución por administración de fluidos por vía intravenosa, pérdidas de sangre durante los procedimientos médicos y la extracción, como se mencionó anteriormente. Por esto la presencia de anemia es tomada como un factor de morbilidad en el paciente crítico. (5) (6)

Las alteraciones en la serie roja más frecuentes detectadas en este trabajo fueron la macrocitosis ($VCM > 95 \text{ fL}$) e hipocromía ($Hb < 28 \text{ pg}$). Datos similares se obtuvieron en estudios de pacientes de UTI con pérdida de sangre crónica. (2)

Por otra parte, la presencia de **eritroblastos** (EB) puede relacionarse con un mal pronóstico en afecciones severas no hematológicas. Los EB son eritrocitos inmaduros normalmente presentes en la sangre periférica de neonatos. En las demás condiciones la presencia de EB en sangre periférica podría indicar un desorden en el mecanismo de producción de eritrocitos ya que su presencia se asocia a un incremento en la actividad eritropoyética (por ej. Episodios hemolíticos agudos y estrés hipóxico severo) o como resultado del daño en el microambiente de la médula ósea. A su vez, el valor predictivo para la muerte en semanas incrementa directamente con la concentración de EB en sangre periférica. En la población estudiada se encontró un 3,9% de muestras con EB, valor menor al observado en otros estudios analizados. (7) (8) (9) Debe señalarse que el límite de detección de EB en FSP es de 200/uL mientras que en sistemas automatizados disminuye a 100/uL (10), lo que podría explicar esta diferencia.



CONCLUSIÓN

El examen del FSP es una herramienta fundamental en el laboratorio clínico ya que permite detectar alteraciones morfológicas de los elementos formes de la sangre, es sencillo de realizar, rápido y poco costoso. Además, permite dar información de relevancia en el diagnóstico que no se puede sustituir por la utilización de equipamiento automatizado ya que depende de la interpretación, en un contexto clínico, de un observador que debe estar correctamente preparado. Es por esto que quise obtener un mayor entrenamiento en la obtención de un buen frotis coloreado, su correcta lectura e interpretación, de manera de poder informar un hemograma correctamente en mi práctica profesional. A su vez me permitió ser consciente de la sensibilidad de las diferentes pruebas, lo que me ayudará a poder explicar la utilidad, o no, al médico tratante de manera que el equipo de salud pueda tomar las decisiones terapéuticas correctas en beneficio del paciente.

A partir de esta experiencia se pudo realizar el estudio estadístico de pacientes que transitaban la UTI del Hospital Escuela Gral. José de San Martín, relacionando la presencia de anemia y EB como marcadores de mal pronóstico.

Además, en mi paso por el hospital pude practicar con pacientes reales, tuve la oportunidad de realizar extracciones y distribuir la muestra según el pedido médico, colorear y leer correctamente un FSP, estimación de plaquetas, colorear extendidos y realizar la estimación de reticulocitos, utilizar un contador hematológico de 3 DIFF, medida de la VSG, realizar pruebas de coagulación manuales y semi automatizadas y poder asistir al médico hematólogo en aspirados de médula ósea. Todas estas experiencias me ayudaron a reafirmar el valor de la muestra de sangre y la importancia que tiene esta para el paciente que busca ayuda en el equipo de salud.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todo el personal del Hospital Escuela Gral. José de San Martín por haberme incluido con la mejor predisposición a su equipo de trabajo, enseñado a desempeñarme dentro de un laboratorio clínico y haber contribuido tanto en mi crecimiento académico como personal. Principalmente al área de Hematología y Hemostasia donde destaco la labor de mi directora, Ivan, María Victoria, Especialista en Bioquímica Clínica-Área Hematología, que, junto a su equipo de trabajo, Bioquímica Roxana Beatriz Encina, el Dr. Gregorio Buchovsky (Médico Hematólogo) y el Técnico en Laboratorio Gerardo Exequiel Escobar que colaboraron en la orientación de mis prácticas.

MARIA VICTORIA IVAN
Bioquímica
Hematología Clínica
M.P. 579

Nombre y Apellido: Teixeira Pinto, Milton Nery
DNI: 32.516.036
CEL: 3794265196
E-mail: teixeiranery@gmail.com



Bibliografía

1. **Vives Corrons, J L., Aguilar Bascomte, J. L.** *Manual de técnicas de laboratorio en hematología*. Barcelona : Elsevier España, S. L., 2014.
2. *Importancia del estudio del frotis de sangre periférica en ancianos*. **Terry Leonard, N. L. y A., Mendoza Hernández C.** 3, 2017, Medisur, Vol. 15, págs. 362-382.
3. *Caracterización demográfica y epidemiológica de la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital de Especialidades CARlos Andrade MARín de los años 2014, 2015 y 2016*. **Salazar Coba S. D., Guerrero Toapanta F., del Pozo G.** 1, s.l. : REVISTA MÉDICA - CIENTÍFICA CAMbios HCAM, 2018, Vol. 17.
4. *Concentraciones de hemoglobina para diagnosticar la anemia y evaluar su gravedad*. **Organización Mundial de la Salud**. Ginebra : Organización Mundial de la Salud, 2011.
5. *Manejo de la anemia en el paciente crítico. ¿Cuándo conviene transfundir?* **Romero C., Roemro V.** 6, 2017, Revista Argentina de Terapia Intensiva, Vol. 34.
6. *Hospital-Acquired Anemia: Prevalence, Outcomes, and Healthcare Implications*. **Koch C. G., Li L., Sun Z., Hixson E. D., Tang A., Phillips S. C., Blackstone E. H., Henderson M.** 9, s.l. : Journal of Hospital Medicine, 2013, Vol. 8.
7. *Evaluation of nucleated red blood cells in the peripheral blood of hematological diseases*. **Danise, P., y otros.** 2, 2012, Clin Chem Lab Med, Vol. 50, págs. 357-360.
8. *High in-hospital mortality of intensive care patients with nucleated red blood cells in blood*. **Stachon A., Holland-Letz T., Krieg M.** 2, 2004, Clin Chem Lab Med, Vol. 42, págs. 933-938.
9. *Getting back to zero with nucleated red blood cells: following trends is not necessarily a bad thing*. **Shah R., Reddy R., Horst M., Stassinopoulos J., Jordan J., Rubinfeld I.** 2012, The American Journal of Surgery, Vol. 203, págs. 343-346.
10. *Nucleated red blood cells in the blood of medical intensive carepatients indicate increased mortality risk: a prospective cohort study*. **Stachon A., Segbers E., Holland-Letz T., Kempf R., Hering S., Krieg M.** 3, 2007, Critical Care, Vol. 11, págs. 1-8.