

RECOMENDACIONES PARA LA TINCIÓN DE FROTIS SANGUÍNEOS PARA LA LECTURA DEL HEMOGRAMA

AUTORES

T.M. Eduardo Retamales Castelletto.

Jefe de Sección de Hematología e Inmunohematología,
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.

T.L. Vanessa Manzo Garay.

Técnico de Laboratorio de la Sección de Hematología e
Inmunohematología.
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.

REVISORES EXTERNOS

COMITÉ DE EXPERTOS MORFOLOGÍA SANGÜÍNEA

Dra. María Elena Cabrera Contreras.

T.M. Mg Cs José Díaz Garrote.

T.M. Silvia Labra Jéldres.

T.M. Marta Maffioletti Benitez.

T.M. Ivette Pape Larré.

T.M. Marta Romero Meza.

Dra. María Soledad Undurraga Sutton.

RECOMENDACIONES PARA LA TINCIÓN DE FROTIS SANGUÍNEOS PARA LA LECTURA DEL HEMOGRAMA

RESUMEN

Este documento presenta las recomendaciones para la tinción de frotis sanguíneo con los lineamientos técnicos para el adecuado proceso de tinción de muestras de sangre mediante el contraste que generan los colorantes que habitualmente se utilizan en laboratorio clínico. La afinidad tintoreal que desarrollan los componentes celulares dado su comportamiento ácido, básico o neutro conlleva la unión de ciertos componentes químicos presentes en los colorantes lo que permite el adecuado reconocimiento de células y estructuras celulares en una amplia variedad de muestras. De esta manera, la tinción amplifica la capacidad resolutive de la observación microscópica de estos elementos para que sean expresados a través de la descripción de las características morfológicas de los distintos componentes celulares. El correcto diagnóstico de laboratorio, se basa en la aplicación del método de referencia, lectura profesional por Tecnólogo Médico y Médicos Hematólogos, para establecer en el informe del frotis sanguíneo el apoyo diagnóstico del clínico.

Se concluye que la fidelidad del diagnóstico de laboratorio permitirá contribuir a establecer pronóstico, diagnóstico, monitoreo y tratamiento del paciente.

ALCANCE

Estas recomendaciones aplican a los laboratorios clínicos públicos y privados que realizan análisis de muestras de sangre que requieren este tipo de tinción.

INTRODUCCIÓN

El rol del laboratorio de hematología consiste en integrar el análisis automatizado de las muestras (hematimetría), la observación microscópica de las células y elementos celulares de la sangre a través de la descripción en el hemograma de las características morfológicas de la serie eritrocitaria, leucocitaria y plaquetaria. La descripción morfológica realizada por un Tecnólogo Médico o Médico Hematólogo confirma el método de referencia para que el facultativo que prescribe la solicitud de examen, tenga información o mayores antecedentes para establecer el diagnóstico clínico. En base a esta premisa es que son relevantes las condiciones que presentan las láminas de frotis sanguíneos al momento de su análisis, tanto por la preservación de los elementos celulares como por la calidad de la tinción. Esta última logra la diferenciación de las células y con ello se facilita el correcto diagnóstico de laboratorio. Por el contrario, una tinción deficiente afecta la visualización celular y en consecuencia la calidad del análisis pudiendo ser omitidas descripciones u observaciones dependientes de la correcta tinción del frotis sanguíneo, arriesgando la orientación correcto diagnóstico y las probables consecuencias para el manejo del paciente.

DESARROLLO

FUNDAMENTO DE LAS TINCIONES

El color desarrollado por medio de tinciones de células, elementos celulares y estructuras celulares, está basado en la afinidad tintoreal de los colorantes utilizados.

En primer lugar el Azul de Metileno (AM) es el cloruro de tetrametiltionina, un colorante básico de anilina derivado de la fenotiacina.

Uno de los métodos más fecundos de la Técnica Neurohistológica fue el imaginado por Ehrlich, en 1885, utilizando la inyección de (AM) para la demostración de la morfología de las neuronas y, especialmente, para la demostración de las arborizaciones terminales periféricas de los cilindroejes.

Se le conoce como colorante vital en el campo de la Neuroanatomía. Los colorantes vitales se clasifican, según su carga eléctrica, en básicos -cargados positivamente- y ácidos. El AM y sus derivados -Azur B, Azur A, Azur C y la Tionina se utilizan, también, en los laboratorios de Hematología para la tinción y la diferenciación de los elementos sanguíneos. Cada uno de estos colorantes básicos es capaz de formar una sal con la eosina - por ejemplo, Eosinato de Azul de Metileno.

Las mezclas de estos colorantes básicos de anilina - y de sus sales - con la eosina tiñen el núcleo y los citoplasmas de diferente color, dependiendo del pH. La mezcla de Eosina (color naranja), con Azur da origen a Eosinato de Azur - un colorante neutro que tiñe la cromatina nuclear de un color violeta-rojizo característico. Esta peculiar coloración no se puede explicar por las propiedades colorantes de la Eosina, del Azul ni del Azur y recibe el nombre de "Efecto Giemsa".

La coloración de May-Grunwald no presenta este fenómeno que se debe a la presencia del Azur. La mayoría de los colorantes de Anilina - y sus eosinatos - son poco solubles en agua pero se disuelven bien en alcohol metílico. La solución madre preparada con alcohol metílico, se diluye en agua antes del uso de tal manera que los distintos colorantes empiezan a precipitar; este proceso de precipitación se aprovecha para obtener una coloración -por precipitación- de las diferentes estructuras de las células sanguíneas; como consecuencia, las soluciones se utilizan una sola vez. Para diluirlas se utiliza agua destilada hervida, a pH neutro, y desprovista de CO₂.

En método May Grünwald – Giemsa, es una de las tinciones de referencia tipo Romanowsky para la tinción de células sanguíneas y es utilizada para la diferenciación en variadas matrices biológicas. El colorante May Grünwald contiene eosinato de azul de metileno que tiñe sustancias acidófilas (tinción de citoplasma) en alcohol metílico (fija la muestra); y el colorante Giemsa, formado por una solución metilica y glicerínica de eosina azul de metileno y azur II (derivado de oxidación del azul de metileno) con afinidad por la cromatina y granulaciones azurófilas.

La tinción de Wright, es otro tipo de tinción tipo Romanowsky alternativamente utilizada en los laboratorios y es conocida como tinción policromática, debido a que produce diversos colores. Es una solución de metanol (fijador de la muestra), eosina (colorante ácido) y azul de metileno (colorante básico), los que son muy sensibles a las variaciones de pH de las estructuras. Es una modificación de la tinción de Romanowsky para tinción diferencial de células y elementos celulares. La coloración característica azul o rosa es el producto de la combinación de los colorantes purificados de eosina y tiazina.

El hecho de usar una u otra tinción es una decisión del laboratorio, todas se basan en el principio de Romanowsky referenciado en CLSI.

TINCIÓN MAY GRUNWALD GIEMSA

MUESTRA

Se debe usar sangre anticoagulada con EDTA (K2EDTA o K3EDTA) entre 1,5 a 2,2 mg de EDTA por ml de sangre.

Preparar 3 extensiones en láminas de vidrio, la lámina debe cumplir con los siguientes requisitos: lámina de 25 x 75 mm y 0.8 a 1.2 de grosor, de vidrio de buena calidad de primer uso y cuidadosamente lavados en alcohol al 70 %.

La laminilla para realizar la extensión en 45° debe tener menor ancho que la lámina y requiere disponer de bordes pulidos. El frotis sanguíneo debe secarse a temperatura ambiente por 10-15 minutos posterior a la extensión y teñir dos de ellos dentro de 2 horas y guardar el último sin tinción fijado en metanol.

Las condiciones de la conformación de la extensión del frotis sanguíneo es contar con una superficie basal o cabeza que es donde se colocan los 8 µL de sangre total, la continuidad llamada cuerpo donde se expresa la coloración de la tinción y la cola o término de la extensión. La lectura al microscopio se realiza entre el término del cuerpo y el inicio de la cola, zona en que los eritrocitos se encuentran dispuestos sin superposición o vecinos. De acuerdo a la CLSI donde visualmente al frotis el 50 % de los eritrocitos se encuentran sobrepuestos, estos elementos formes se disgregan en la siguiente región donde los eritrocitos muestran una fuerte tendencia a la orientación lineal.

REACTIVOS E INSUMOS

- a) Metanol absoluto.
- b) Tinción May Grünwald.
- c) Tinción de Giemsa.
- d) Buffer Fosfato pH 6,4 -7,0.
- e) Soporte para portaobjetos de disposición horizontal.
- f) 4 Cubetas de tinción (para teñir 25 portaobjetos).
- g) Cestillos de tinción compatibles con las cubetas.

INSTRUCCIONES PARA LA PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- a) Metanol absoluto: cambiar diariamente.
- b) May Grünwald concentrado: reactivo comercial se encuentra listo para su uso.
- c) May Grünwald 50%: preparar diluyendo May Grünwald concentrado con buffer fosfato.
- d) Giemsa diluído: preparar diariamente mezclando una parte de Giemsa con 9 partes de Buffer Fosfato (dilución al 5%), mezclar bien y dejar reposar por 10 minutos antes de utilizar (observará una fina capa de color metálico en su superficie).
- e) Buffer Fosfato: Preparar el buffer utilizando KH₂PO₄ y Na₂HPO₄ a una concentración 67 mM (Sörensen) o 5 mM (Weise) a pH en el rango de 6,4 – 7,0. Es importante indicar que el uso de buffer fosfato comercial (Sörensen o Weise) permite reproducir la tinción eliminando la variabilidad cuando se utiliza agua corriente o destilada; la experiencia con cada marca comercial depende del laboratorio.
- f) Buffer fosfato según Sörensen (67 mM) diluir 1:20 con agua destilada. Ejemplo para preparar 1L o 5L de Buffer Fosfato a partir de KH₂PO₄ (anhidro) y Na₂HPO₄ x 7 H₂O. (ver tabla).

TIPOS DE BUFFER	pH	Molaridad	GRAMOS PARA 1 L		GRAMOS PARA 5 L	
			Na ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄	Na ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄
Sorensen	6.4	0.067	2.41	7.90	12.05	39.50
Sorensen	6.6	0.067	3.54	7.32	17.70	36.60
Sorensen	6.8	0.067	5.03	6.56	25.15	32.80
Sorensen	7.0	0.067	6.85	5.64	34.25	28.20
Sorensen	7.2	0.067	8.88	4.61	44.40	23.05
Sorensen	7.4	0.067	8.88	4.61	44.40	23.05
Weise	6.4	0.005	0.18	0.59	0.90	2.95
Weise	6.6	0.005	0.26	0.55	1.30	2.75
Weise	6.8	0.005	0.38	0.49	1.90	2.45
Weise	7.0	0.005	0.51	0.42	2.55	2.10
Weise	7.2	0.005	0.66	0.34	3.30	1.70
Weise	7.4	0.005	0.81	0.27	4.05	1.35
Wright	6.4	0.0083	0.30	0.98	1.50	4.90
Wright	6.6	0.0083	0.44	0.91	2.20	4.55
Wright	6.8	0.0083	0.62	0.81	3.10	4.05
Wright	7.0	0.0083	0.85	0.70	4.25	3.50
Wright	7.2	0.0083	1.10	0.57	5.50	2.85
Wright	7.4	0.0083	1.350	0.440	6.75	2.20

PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN

Tinción horizontal o vertical en cubetas de tinción (Coplin, Hellendahl Schiefferdecker).
En caso de tinción vertical en Coplin o Hellendahl la cabeza del frotis quedará orientada hacia arriba.

A un frotis seco e identificado:

Tinción May Grunwald – Giemsa
Materiales a utilizar
<ul style="list-style-type: none"> • Buffer fosfato pH 6,8. • Colorante May Grunwald. • Colorante Giemsa diluido al 5%.
Proceso
<ol style="list-style-type: none"> 1.- Cubrir muestra con solución May Grünwald por 5 minutos. 2.- Eliminar colorante y cubrir muestra con buffer pH 6,8 por 2 minutos. 3.- Estilar buffer y cubrir muestra con solución Giemsa diluido al 5% por 10 minutos. 4.- Realizar enjuague con agua potable hasta que el agua salga clara. 5.- Dejar secar en soporte de secado.

CALIDAD DE LA TINCIÓN-MACROSCÓPICA

Cabeza del frotis rosada o azul dependerá del pH empleado y cola del frotis – ver figura:

Evaluación de la Calidad de la Tinción May Grünwald – Giemsa

CRITERIO MACROSCÓPICO

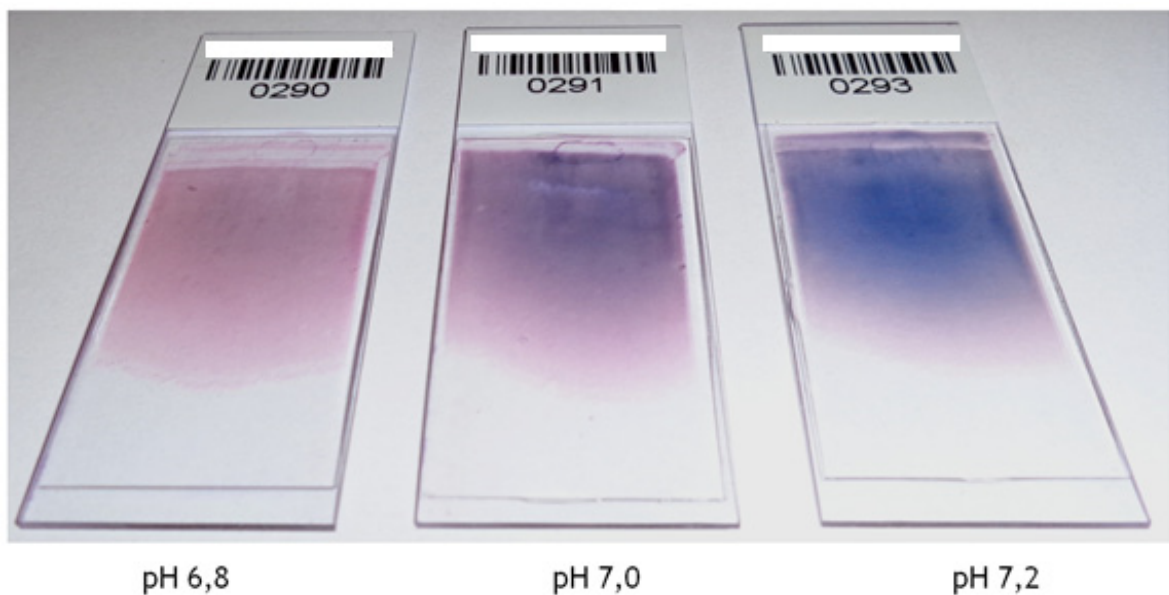


Figura 1:

Frotis 0290 confeccionado con buffer pH 6,8 que presenta características ácidas y está expresado en color rosado; frotis 0291 confeccionado con buffer 7,0 que presenta características neutras y está expresado en color gris café; frotis 0293 confeccionado con buffer 7,2 que presenta características básicas y está expresado en color azul. (Imagen: gentileza del Profesor T.M. MCs José Díaz G. Universidad de Chile).

RESULTADOS ESPERADOS

- Eritrocitos:** coloración rosada más intenso en la periferia que en el centro, debido a su grosor y forma bicóncava.
- Plaquetas:** color rosa pálido con pequeñas granulaciones de color púrpura.
- Neutrófilos:** núcleo violeta oscuro, picnótico, con varios lóbulos unidos por puentes de cromatina. Citoplasma rosa pálido con pequeños gránulos (granulación secundaria).
- Eosinófilos:** núcleo violeta oscuro, picnótico, con dos lóbulos unidos por puentes de cromatina. Citoplasma gris rojizo refringente constituido por gránulos medianos.
- Basófilos:** núcleo violeta oscuro de forma irregular con lobulaciones que no se observan por superposición de la granulación citoplasmática. Citoplasma basófilo repleto de gránulos azul negruzco.
- Monocitos:** núcleo violeta claro, redondeado, ovalado o con escotadura que le da aspecto arriñonado. Citoplasma grisáceo en vidrio esmerilado que puede presentar vacuolas y algunas granulaciones azurófilas.
- Linfocitos:** núcleo redondo azul oscuro con cromatina condensada. Citoplasma azul pálido o celeste límpido debido a ligera basofilia que le confiere su contenido en ARN. Puede presentar granulación azurófila que frecuentemente se encuentra en un área marginal del citoplasma.

OTROS TIPOS DE TINCIÓN ROMANOWSKY

Tinción Wright
Materiales a utilizar
<ul style="list-style-type: none">• Colorante Wright.• Buffer fosfato pH 6.8
Proceso
<ol style="list-style-type: none">1.- Cubrir frotis con solución Wright por 5 a 8 minutos.2.- Agregar directamente al colorante un volumen igual de buffer 6,8. Esperar formación de brillo metálico. Dejar actuar de 6 a 10 minutos.3.- Enjuagar con agua potable.4.- Dejar secar en soporte de secado. La extensión debe presentar una coloración rosada a simple vista.

Tinción Wright Giemsa
Materiales a utilizar
<ul style="list-style-type: none">• Metanol.• Colorante Wright.• Agua destilada (ver opción de buffer pH 6,8).• Colorante Giemsa.• Ácido acético 0.5%.
Proceso
<ol style="list-style-type: none">1.- Cubrir la muestra con metanol por 5 minutos para fijar muestra. Luego dejar secar.2.- Cubrir con colorante Wright por 2 minutos.3.- Agregar el mismo volumen de agua destilada y mezclar con el colorante Wright. Dejar actuar por 2 minutos.4.- Enjuague con agua potable.5.- Cubrir con Giemsa por 1 minuto.6.- Enjuague con agua potable y luego con ácido acético al 0,5%7.- Dejar secar en soporte.

CAUSAS DE ALTERACIONES EN LA CALIDAD DE LA TINCIÓN

El control de calidad de la tinción del frotis sanguíneo es realizada por turno de trabajo o por “corrida analítica” determinada por el laboratorio. De la misma manera, el laboratorio elabora el registro (control documental) para el control diario de la tinción.

En formulario anexo se presenta el registro del control de tinción del frotis sanguíneo.

1. Coloración excesivamente azul:
 - a) Frotis muy gruesos.
 - b) Tiempo con colorante prolongado (sobretinción).
 - c) Lavado insuficiente.
 - d) Colorante alcalino.

2. Coloración excesivamente rosada:
 - a) Tinción insuficiente.
 - b) Enjuague prolongado.
 - c) Colorantes o amortiguador muy ácidos.
3. Presencia de precipitado:
 - a) Portaobjetos sucios al momento de extender.
 - b) Secado de láminas insuficiente.
 - c) Acción excesiva de solución fijadora.
 - d) Enjuague final insuficiente.
 - e) Filtración inadecuada de colorante.
4. Otras alteraciones:
 - a) Artefactos morfológicos por anticoagulante usado.
 - b) Artefactos por suciedad, deterioro o presencia de grasa en la lámina.
 - c) Hidratación de los glóbulos rojos.

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS ELEMENTOS FORMES DE LA SANGRE TEÑIDOS CON MAY GRÜNWARD GIEMSA.

1. **Hematíe o eritrocito:** son los elementos más maduros de la eritropoyesis. Su principal misión es la captación de oxígeno y su transporte a los tejidos. Son elementos anucleados, acidófilos y de forma redondeada u oval. Se caracteriza por una coloración gris rojiza que visualmente se presenta con una depresión central o zona más clara en el centro. Al cortar transversalmente se observa que tiene una forma de disco bicóncavo de unas 2 micras de espesor y de diámetro aproximado de 7 micras.
2. **Neutrófilo en banda:** su tamaño es de 12 – 14 micras. Se caracteriza por su núcleo en forma de C, S, P, M, U, T, R, W, O, etc. y cromatina condensada en grumos, citoplasma abundante, acidófilo y cubierto de finas granulaciones específicas.
3. **Neutrófilo segmentado:** contiene numerosos gránulos neutrófilos que se tiñen de color gris marrón con las coloraciones panópticas habituales, presenta también gránulos primarios o azurófilos, difícilmente visibles al quedar sobrepuestos por los gránulos neutrófilos. Su tamaño oscila entre 12 – 14 micras. Su núcleo presenta de 2 a 5 lóbulos unidos por finos puentes de cromatina. La cromatina del núcleo es picnótica, no presenta nucléolos.
4. **Eosinófilo:** tiene un tamaño semejante a los neutrófilos, se caracterizan por tener en su citoplasma gránulos acidófilos que poseen una forma redondeada con un tamaño de 0,5 y 1,5 micras, ocupan todo el citoplasma de la célula y se tiñe de color gris rojizo o marrón anaranjado, siendo refringentes. El núcleo es generalmente bilobulado, pudiendo en algunas ocasiones tener tres lóbulos, presentan cromatina picnótica.
5. **Basófilo:** su tamaño oscila entre 10 y 13 micras. El núcleo de cromatina picnótica posee generalmente 2 o 3 lóbulos unidos por puentes cromatínicos, en ocasiones difíciles de visualizar, dada la presencia

de numerosas granulaciones basófilas que se superponen al núcleo. El tamaño de las granulaciones varían entre 0,2 y 1 micra. Ocasionalmente los gránulos basófilos se disponen al interior de vacuolas citoplasmáticas, imagen óptica que traduce la disolución parcial de estos gránulos secundarios a la fijación. La característica principal de los gránulos es su metacromasia con los colorantes azules, adquiere tonalidad azul negruzca.

6. **Monocito:** es una célula de 15 a 30 micras. Posee un núcleo central irregular reniforme y circunstancialmente plegado. Cromatina reticulada de aspecto en malla. No se observan nucléolos y el citoplasma es abundante, levemente basófilo, se pueden observar presenta finas granulaciones azurófilas.
7. **Linfocito:** se clasifican en linfocitos pequeños, medianos y grandes. El linfocito pequeño posee un diámetro que oscila entre 6 y 10 micras. El núcleo es relativamente voluminoso y ocupa la mayor parte de la célula, la cromatina es condensada y no se aprecian nucléolos. El citoplasma es escaso y se dispone en forma de una estrecha franja perinuclear, es de basófilo moderada; no presenta granulaciones. Los linfocitos medianos tienen un diámetro entre 11 a 15 micras y los linfocitos grandes poseen un diámetro entre 16 a 25 micras. El núcleo es de cromatina menos condensada y se sitúa en posición central o algo excéntrica. El citoplasma es más abundante de basofilia leve y pueden observarse gránulos azurófilos.
8. **Plaquetas:** las plaquetas desprendidas de los megacariocitos adultos pasan a sangre periférica donde ejercen sus funciones en los mecanismos de la coagulación y hemostasia. Tienen un tamaño de 2 a 3 micras, están desprovistas de núcleo. En los frotis se observan con frecuencia aglomeradas debido a su gran capacidad de agregación. Presentan dos zonas claramente delimitadas, una central donde se disponen las granulaciones azurófilas denominadas cromómero y otra periférica hialina e incolora denominada hialómero.

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS PRECURSORES HEMATOPOYÉTICOS TEÑIDOS CON MAY GRÜNWARD GIEMSA

1. **Serie granulopoyética:** las células de la granulopoyesis constituyen un 60 – 65% de los componentes citológicos medulares normales.
2. **Mieloblasto:** tiene un tamaño de 15 – 20 micras. Posee un núcleo grande, quedando un halo citoplasmático, a veces excéntrico. El núcleo es esférico, y se visualizan de 3 o más nucléolos que con Giemsa toman un color rojo pálido. Su cromatina es laxa, finamente reticular. El citoplasma es de basofilia moderada y normalmente no presenta granulaciones, aunque si las hay son escasas y de tipo azurófilas.
3. **Promielocito:** su tamaño es de 16 – 25 micras. Es la célula de mayores dimensiones en la granulopoyesis normal. Su núcleo es redondeado y de posición excéntrica. La cromatina es laxa y de menor basofilia respecto al Mieloblasto. Aparece cubierto por granulaciones azurófilas groseras, las cuales se pueden observar encima del núcleo. Existe una zona agranular perinuclear, correspondiente al arcoplasma.
4. **Mielocito:** su tamaño es de 12 – 18 micras. Núcleo esférico con cromatina laxa y su posición normalmente excéntrica. El citoplasma es abundante, ligeramente acidófilo. A partir de este estadio comienza la formación de granulaciones específicas (neutrófila, basófila y eosinófila) coexistiendo con las granulaciones primarias.
5. **Juvenil:** su tamaño es de 10 – 15 micras. Presenta un núcleo excéntrico y de forma arriñonada con cromatina condensada. El citoplasma es acidófilo pero se encuentra cubierto por abundantes granulaciones específicas o secundarias. En este estadio madurativo la célula ha perdido su capacidad mitótica.

6. **Serie eritroblástica:** en condiciones normales la serie eritroblástica representa del 25 – 30% de los elementos nucleados de la médula ósea.
7. **Proeritroblasto:** posee un tamaño de 20 – 25 micras. Presenta un núcleo grande que ocupa la mayor parte de la célula y es de posición central. La cromatina es laxa y se observan de 1 – 2 nucléolos. El citoplasma es intensamente basófilo al ser rico en polirribosomas. La membrana citoplasmática puede presentar prolongaciones gruesas.
8. **Eritroblasto basófilo:** de menor tamaño que el proeritroblasto 15 – 18 micras. Posee un núcleo central y redondo, con cromatina menos laxa. No se observan nucléolos. El citoplasma conserva la basofilia o inclusive puede presentar mayor intensidad que su precursor.
9. **Eritroblasto policromático:** el tamaño puede variar de 8 – 12 micras. Presenta un núcleo redondo y central con cromatina laxa en grumos. El citoplasma comienza a cargarse de un tinte liliáceo por la superposición de la basofilia ribosómica con la acidofilia que produce la aparición de la hemoglobina. Es la última célula de la serie con capacidad mitótica.
10. **Eritroblasto ortocromático:** su tamaño es de 9 – 10 micras. El núcleo es redondo con cromatina picnótica y de aspecto uniforme. Se lo suele observar en posición central o excéntrica (si está próximo a extruirse). Su citoplasma acidófilo va aumentando su contenido hemoglobínico hasta adquirir la tonalidad propia del hematíe maduro.
11. **Serie megacariocítica:** morfológicamente se distinguen tres estadios madurativos: megacarioblasto, promegacariocito y megacariocito; siendo este último el que más se visualiza. En esta serie las divisiones nucleares no van seguidas de las correspondientes divisiones citoplasmáticas.
12. **Megacarioblasto:** posee un tamaño de 20 – 45 micras. El núcleo es generalmente redondo, oval o levemente indentado, de posición central o excéntrico. La cromatina es laxa. Posee 1 – 3 nucléolos y el citoplasma es de basofilia intensa; se observan frecuentes pseudópodos.
13. **Promegacariocito:** tamaño de 20 – 80 micras. El núcleo es generalmente redondo u oval, de posición central o excéntrico y de cromatina laxa. Puede o no visualizarse los nucléolos. Posee abundante citoplasma basófilo con pseudópodos que contienen finas granulaciones azurófilas.
14. **Megacariocito:** se caracteriza por su gran tamaño pudiendo medir 80 micras o más. Presenta un citoplasma extenso de basofilia leve. El citoplasma presenta granulaciones azurófilas que se disponen normalmente en la periferia de la célula que se encuentran rodeadas por una membrana de demarcación que irá delimitando las futuras plaquetas. El núcleo es multilobulado o segmentado con cromatina condensada, sin nucléolos.
15. **Otras células - Células plasmáticas:** posee un tamaño de 12 – 15 micras. Es de forma ovalada con núcleo de posición excéntrica y cromatina condensada en ruedas de carreta. El citoplasma es abundante de basofilia moderada a intensa. No posee gránulos aunque pueden observarse vacuolas.

ANEXOS

CONTROL DE TINCIÓN

El registro del Control de Tinción debería realizarse cada vez que se prepare la tinción de May Grünwald-Giemsa para realizar el teñido de los frotis sanguíneos. Esta preparación se refiere a las soluciones para los baños de tinción.

El laboratorio de hematología debe elaborar un registro de control de tinción con la identificación del operador, fecha y observaciones encontradas. De esta manera, el supervisor de calidad podrá detectar las brechas de capacitación requeridas para actualizar las competencias técnicas.

CONTROL DE TINCIÓN DEL FROTIS		
Criterios macroscópicos	cabeza del frotis	cola del Frotis
Color		

Criterios microscópicos	color	visualización
I Eritrocitos		

II Leucocitos	basófilo	eosinófilo	segmentado	linfocito	monocito
núcleo					
cromatina					
citoplasma					
gránulos					

III Plaquetas	color	visualización
morfología		

IV Artefactos	precipitado	(+)-------(++)------(+++)------
	eritrocitos refringentes	(+)-------(++)------(+++)------
	crenocitos	(+)-------(++)------(+++)------

Se espera que el frotis sanguíneo teñido con May Grünwald-Giemsa presente las siguientes características:

CONTROL DE TINCIÓN DEL FROTIS		
Criterios macroscópicos	cabeza del frotis	cola del Frotis
Color	gris café	gris café claro

Criterios microscópicos	color	visualización
I Eritrocitos	gris rosáceo	halo central

II Leucocitos	basófilo	eosinófilo	segmentado	linfocito	monocito
núcleo	(*)	bilobulado	lobulado (3, 4, 5)	mononuclear	reniforme
cromatina	azul negruzca	azul negruzca	azul negruzca	fulvia negruzca	celestes esmerilado
citoplasma	(*)	(*)	grisáceo	celestes límpido	celestes esmerilado
gránulos	azul negruzco	gris rojizo	Gris rosáceo	agranular	agranular

III Plaquetas	color	visualización
morfología	Celestes grisáceas	mórcula proyectada

IV Artefactos	precipitado	(+)-----(++)------(+++)----- NO
	eritrocitos refringentes	(+)-----(++)------(+++)----- NO
	crenócitos	(+)-----(++)------(+++)----- NO

(*) cubierto por los gránulos

AGRADECIMIENTOS

Se agradece los aportes recibidos de parte de los participantes del Primer Taller de Hematología para Técnicos realizado en 2015 en el Instituto de Salud Pública.

REFERENCIAS

1. CLSI-H20 A2 – 2007: Reference Leukocyte Differential Count (Proportional) and Evaluation of Instrumental Methods.
2. Iván Palomo G., Jaime Pereira G., Julia Palma. Hematología: Fisiopatología y Diagnóstico. Editorial Universitaria de Talca 2005.
3. Williams Hematology. Kenneth Kaushansky, Marshal Lichtman, Ernest Beutler, Thomas J. Kipps. 8TH Edition 2013.
4. Bernardette F. Rodak. Hematología fundamentos y aplicaciones clínicas. Ed. Médica Panamericana, 2005.
5. Houwen, B. Blood film preparation and staining procedures. Clin Lab Med 22, 1-14, v (2002). Díaz Garrote, J. Guía de procedimiento para laboratorio de hematología en pre grado. Facultad de Medicina, Universidad de Chile. (2013)
6. Vives Corrons, J.L. Guidelines for blood smear preparation and staining procedure for setting up an external quality assessment scheme for blood smear interpretation. Part I: Control material. Clin Chem Lab Med 42, 922-6 (2004).
7. R. W. Sabnis, Handbook of biological dyes and stains synthesis and industrial applications. 2010.