

¿Cómo obtener un extendido de sangre periférica de óptima calidad?

Germán Campuzano Maya¹

*"La calidad de un resultado de laboratorio depende de la calidad de la muestra"
(premisa básica de las buenas prácticas de laboratorio)*

Resumen: a pesar de los grandes avances tecnológicos y el desarrollo de nuevos parámetros en hematología, el extendido de sangre periférica continúa siendo la "prueba reina" en el diagnóstico de las enfermedades hematológicas. Por razones ajenas al objetivo de este módulo, y a la mala utilización de la tecnología, entre otras razones, muchos laboratorios clínicos han menospreciado el valor del extendido de sangre periférica y en consecuencia sólo se limitan a entregar como resultado, el informe "en bruto" que entrega el autoanализador de hematología, sin el más mínimo análisis del extendido de sangre periférica, aun en los casos en donde las alarmas del instrumento así lo exigen, dentro del marco de las buenas prácticas de laboratorio. Para tener un estudio de la morfología de la sangre periférica que pueda ser considerado de óptima calidad, calificación que siempre será posible, necesariamente deberán confluír tres condiciones: (1) que el extendido de sangre periférica sea óptimo, (2) que la coloración sea óptima y (3) que la placa sea analizada por personal idóneo.

Palabras claves: extendido de sangre periférica, método del portaobjeto, método de laminilla.

Campuzano-Maya, G. ¿Cómo obtener un extendido de sangre periférica de óptima calidad? Medicina & Laboratorio 2008, 14: 125-152.

Módulo 4 (Hematología), número 9. Editora Médica Colombiana S.A., 2008®

Recibido el 22 de enero, 2008; aceptado el 18 de febrero, 2008.

Desde 1956, cuando Wallance Coulter inventó el primer contador de células [1], el hemograma como prueba de laboratorio no ha cesado de evolucionar y como resultado ha traído mejoras y también problemas. Con respecto a las primeras, los contadores no sólo han permitido tener resultados tan exactos como impensables con los métodos manuales [2], sino que han aportado, sobre todo los de las últimas generaciones, nuevos parámetros de valiosa utilidad clínica y excelente relación costo beneficio para el paciente y los sistemas de seguridad social [3-8]. Con respecto a los segundos, el hemograma, a pesar de que es una de las pruebas más solicitadas al laboratorio clínico, por razones ajenas a las de este módulo, a la falta de educación continua y a un entrenamiento adecuado en el manejo de estos instrumentos y de los nuevos parámetros, infortunadamente se ha utilizado inadecuadamente, como se analizará más adelante.

1. Médico especialista en Hematología y Patología Clínica. Profesor *Ad Honorem*, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Médico Director, Laboratorio Clínico Hematológico S.A. Medellín, Colombia. Correspondencia: Carrera 43C No. 5-33, Medellín, Colombia. E-mail: gcampuzano@hematologico.com

El objetivo de este módulo es múltiple: (1) llamar la atención sobre el mal uso de los autoanalizadores de hematología, (2) presentar a los profesionales del laboratorio clínico las diferentes opciones de manejo del hemograma electrónico y en particular lo relacionado con el extendido de sangre periférica, como parte integral del hemograma y (3) presentar a la comunidad de usuarios, los médicos, las posibilidades que con respecto al diagnóstico hematológico les proveen los avances tecnológicos cuando se utilizan adecuadamente, acorde con los estándares de calidad [9] y la forma cómo los resultados les deben ser informados, de tal manera que sea la verdadera ayuda que realmente es la prueba y no motivo de confusión, como está sucediendo en muchos casos.

¿Qué está sucediendo con el hemograma y el extendido de sangre periférica en Colombia?

A pesar de los grandes avances tecnológicos de las últimas décadas, en particular los relacionados con el diagnóstico hematológico gracias a la incorporación de los autoanalizadores de hematología en la mayoría de los laboratorios clínicos, no sólo se han mejorado sustancialmente los parámetros convencionales del hemograma sino que se han introducido nuevos parámetros de utilidad clínica, como recientemente se analizó en un módulo anterior en **MEDICINA & LABORATORIO** [10].

Infortunadamente, como resultado de la automatización, y por otras razones que no son objeto de este módulo, el estudio de la sangre periférica ha pasado a un segundo plano, llegando a no hacerse en muchos laboratorios clínicos, como claramente se deduce de los facsímiles de informes del hemograma que se reproducen en las **figuras 1 a 3**, y cuando los hacen, su calidad es tan pobre, como se analizará más adelante, que no es posible tener un buen estudio de sangre periférica, olvidando que “los contadores de células son excelentes pero no perfectos” [11] y en ningún momento pueden reemplazar a un detenido y cuidadoso estudio de un extendido de sangre periférica. Como se observa en los citados informes, algunos de ellos procedentes de laboratorios clínicos de diferentes partes del país, que se comportan como “fábricas de exámenes”, no sólo se ha excluido el extendido de sangre periférica, sino que entrega el resultado “en bruto”, tal y como sale de la máquina, en muchos casos en inglés y en unidades no utilizadas en el medio, sin la más mínima revisión y análisis microscópico del extendido de sangre periférica, aun cuando el instrumento muestra alarmas que así lo exigen dentro de las buenas prácticas de laboratorio. Los laboratorios clínicos que así proceden pareciera que desconocen el papel del laboratorio clínico en el acto médico y olvidan que la solicitud de un prueba de laboratorio es una interconsulta más que “una orden comercial para hacer un examen” [12-15].

De acuerdo con la metodología utilizada y los parámetros que lo componen, en el medio se reconocen seis tipos de hemogramas, debidamente codificados y definidos por la Sociedad Colombiana de Patología Clínica [16] que coinciden en su mayoría con los definidos por el Colegio Americano de Patólogos, que a su vez, son reconocidos por la Asociación Médica Americana y el Colegio Americano de Patólogos [17] y han sido acogidos por el Ministerio de Protección Social de Colombia como base de los manuales de contenidos de los planes de salud (CUPS) [18], con excepción de los hemogramas tipo V y VI, recientemente incorporados a los laboratorios clínicos del país. Desde el punto de vista práctico, los hemogramas se subdividen en dos grandes grupos: (1) los hemogramas manuales, que corresponden a los tipos I y II y (2) los hemogramas electrónicos derivados de los autoanalizadores de hematología, que corresponden a los tipos III, IV, V y VI [19].

Todos los hemogramas del tipo IV a VI, además de los valores cuantitativos propios de cada uno de ellos, generan una serie de gráficos conocidos como histogramas, dispersogramas y citogramas en los cuales se presentan gráficamente algunos de los aspectos más importantes de

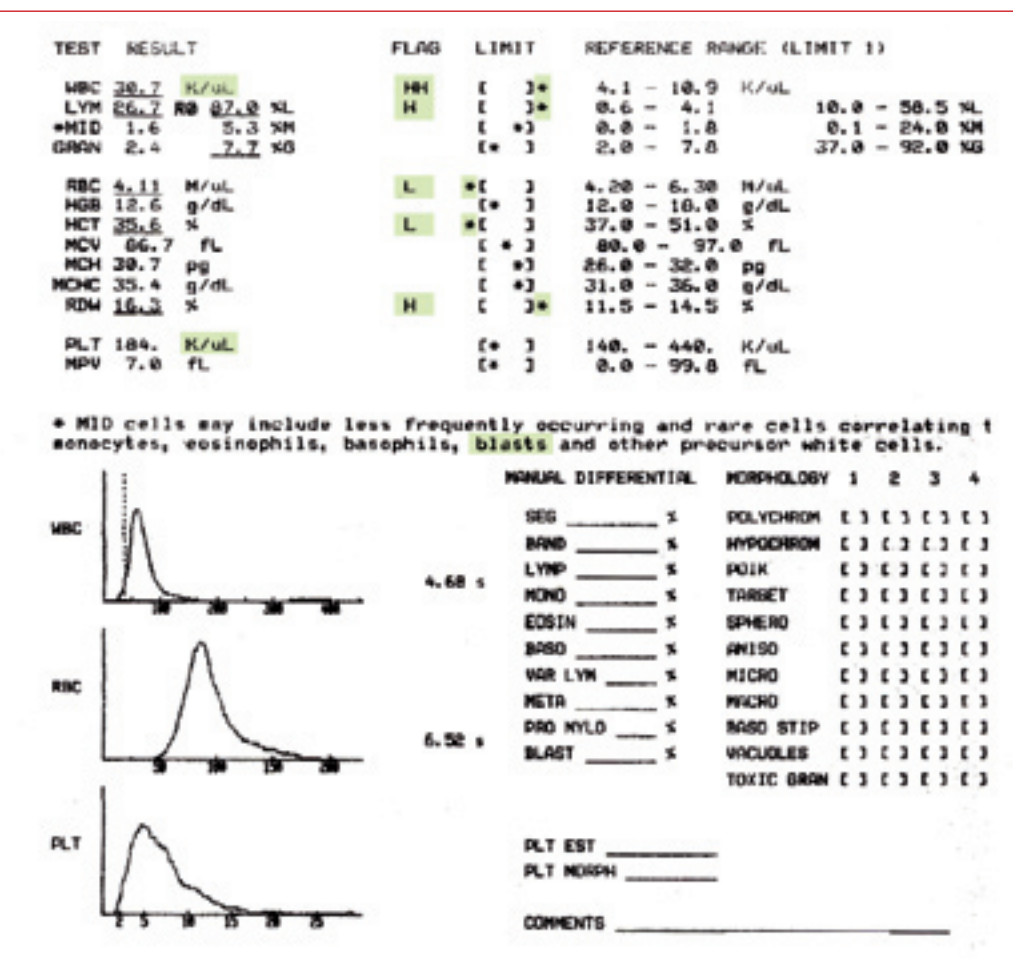


Figura 1. Facsímil de un informe de un hemograma tipo IV. Como se observa, se ha entregado al paciente el hemograma tal como sale del instrumento, en inglés, con los parámetros en siglas y en unidades, como K/uL (en vez de "por μ L") para el recuento de blancos y de plaquetas, desconocidas en el medio. A pesar de las múltiples alarmas como H, HH, L y los asteriscos y la nota con una alarma (resaltada) informando la posibilidad de "blastos" o precursores de células blancas, que, como visiblemente se evidencia en el informe, no hay estudio de extendido de sangre periférica como claramente debió de haberse realizado antes de ser entregado al paciente. Fuente: historia clínica de un paciente de la consulta del autor.

las poblaciones de células analizadas y de los cuales los instrumentos, con la ayuda de software, determinan algunas variables cuantitativas. Por razones desconocidas o que no son objeto de este módulo, en nuestro medio no se le ha dado un adecuado manejo a estos elementos gráficos pues la mayoría de los laboratorios clínicos se limitan a anexarlos como parte integral del hemograma, en muchos casos, "en bruto" como salen de instrumento, inclusive en inglés, en iniciales y con todas las alarmas sin ninguna interpretación, constituyéndose en fuentes de confusión y desinformación más que en una verdadera ayuda para el clínico [20], como se evidencia en las figuras 1 a 3.

Los histogramas, dispersogramas y citogramas que entregan los autoanalizadores de hematología son una excelente herramienta para el laboratorio clínico pero tienen muy poca, o quizás ninguna, utilidad clínica: estos elementos como herramienta del laboratorio clínico son de gran valor debido a que: (1) identifican con gran certeza, mediante alarmas, las principales alteraciones del hemograma, en donde el observador debe poner mayor énfasis en el estudio de sangre periférica, (2) permiten monitorear la veracidad de los hallazgos cuantitativos generados por el

autoanalizador, (3) permiten identificar las posibles causas relacionadas con resultados erróneos generados por los autoanalizadores, y (4) le permiten al examinador presumir un determinado diagnóstico [20]. Al médico le debe llegar el informe del hemograma tan claro como sea posible, muy similar al facsímil del informe de un hemograma tipo VI que se reproduce en la **figura 4** (la hoja de trabajo) y en la **figura 5** (el informe final del hemograma).

¿Cuándo hacer o solicitar un estudio del extendido de sangre periférica?

Hacer o no hacer extendido de sangre periférica como parte integral del hemograma depende del método utilizado para hacerlo y de las necesidades del médico, siempre en un determinado contexto clínico. Se dan dos situaciones en particular: los hemogramas manuales y los hemogramas electrónicos.

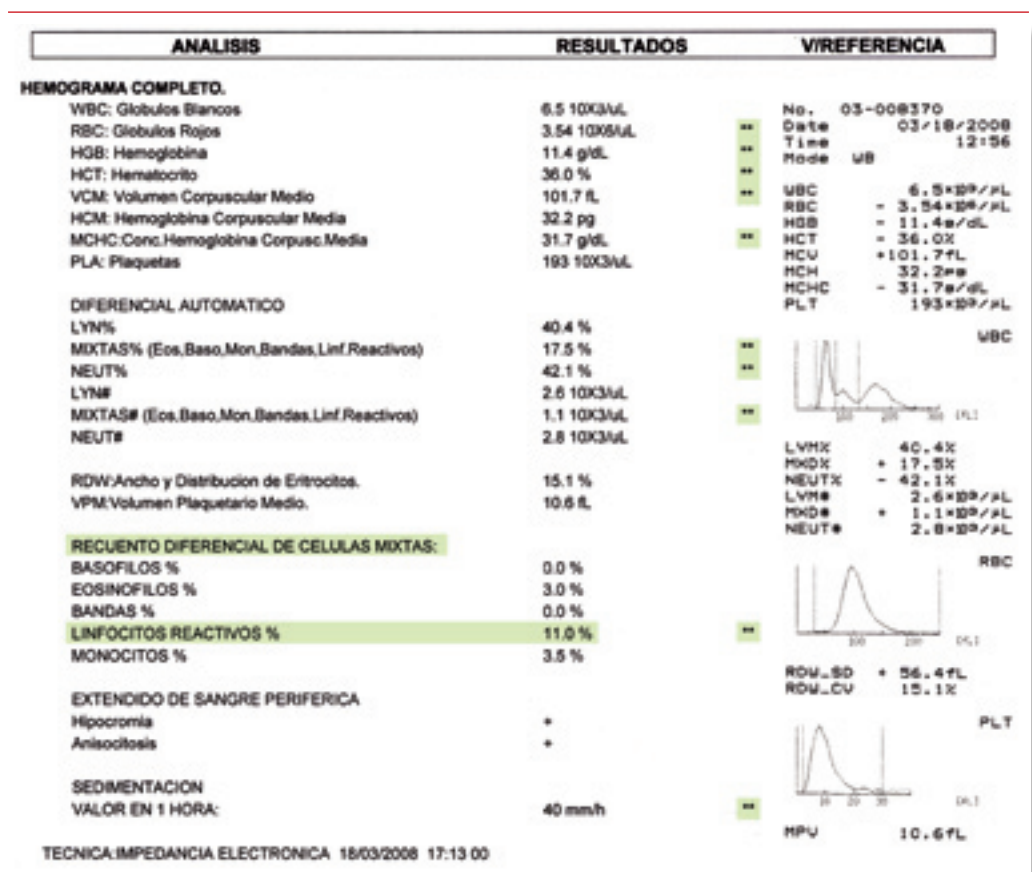


Figura 2. Facsímil de un informe de un hemograma tipo IV. Como en el caso anterior, el laboratorio clínico se limitó a entregar al paciente el informe tal cual sale del instrumento, en inglés y con los parámetros en siglas. De acuerdo con lo que se observa en el informe hay una anemia señalada con múltiples asteriscos, un recuento diferencial de tres partes con un asterisco que llama la atención sobre la presencia de "linfocitos reactivos". Además en la parte lateral derecha se ha pegado al informe la tirilla del instrumento y si se mira con detenimiento, los valores de la tirilla han sido transferidos a la "hoja de informe". De acuerdo con esta metodología, en este hemograma que corresponde al tipo IV en donde el recuento diferencial de leucocitos convencional (de cinco partes que incluye polimorfonucleares neutrófilos, polimorfonucleares eosinófilos, polimorfonucleares basófilos, linfocitos y monocitos), debe hacerse manualmente y las alarmas relacionadas con la anemia y la linfocitosis habrían sido indicación para un estudio completo del extendido de sangre periférica, que no se evidencia en este informe. Además, llama la atención de un término ajeno al laboratorio clínico estándar o a la hematología como es "recuento diferencial de células mixtas". Es claro que este tipo de hemogramas, por lo menos de informe, desorienta más que cumple con su objetivo como prueba de laboratorio. Fuente: historia clínica de un paciente de la consulta del autor.

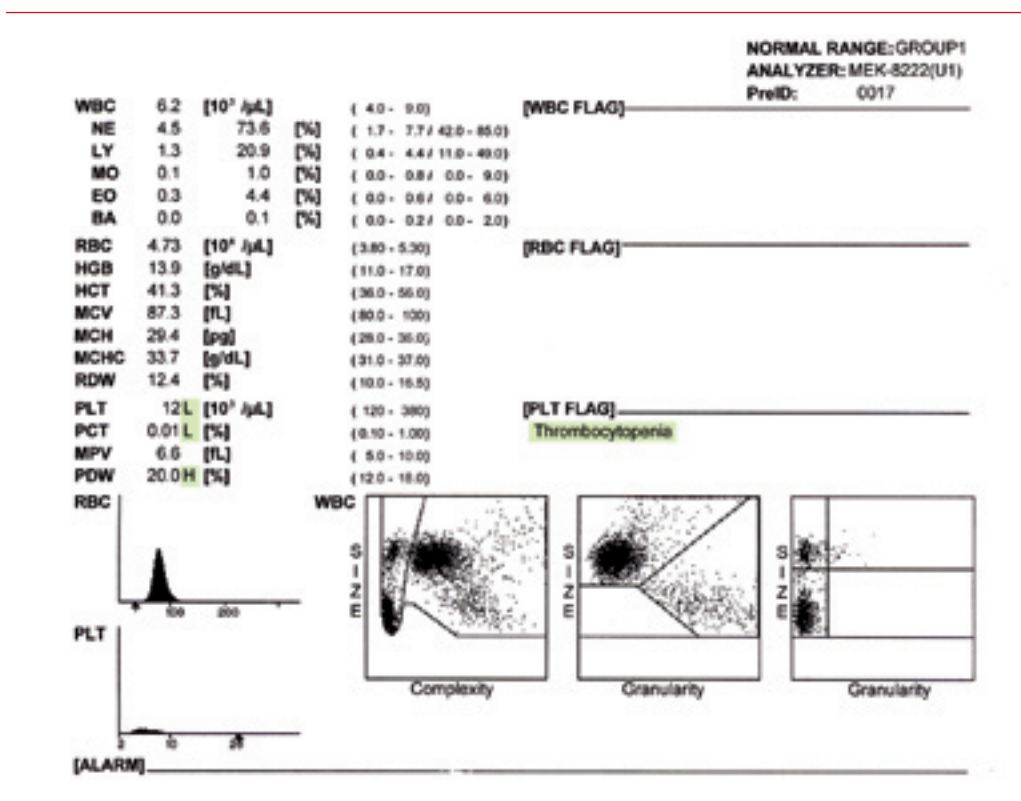


Figura 3. Facsímil de un informe de un hemograma tipo V. Como en el caso anterior, el laboratorio clínico se limitó a entregar al paciente el informe tal como sale del instrumento, en inglés y con los parámetros en siglas. De acuerdo con las alarmas L, H y “thrombocytopenia” de 12.000 plaquetas por μ L, claramente debía haber sido completado con un estudio del extendido de sangre periférica que obviamente no se realizó en este paciente como se evidencia en este informe. Fuente: historia clínica de un paciente de la consulta del autor.

Hemograma manual

Como su nombre lo indica, en los hemogramas tipo I y II, de acuerdo con la Sociedad Colombiana de Patología Clínica [19] y el Ministerio de Protección Social [18], acorde con los estándares internacionales y las buenas prácticas de laboratorio, los parámetros cuantitativos se determinan por instrumentación básica, en particular con pipetas y cámara de Neubauer [10], y los parámetros cualitativos y el recuento diferencial de leucocitos se derivan, en todos los casos, del estudio del extendido de sangre periférica realizado por profesionales debidamente capacitados para ello [21, 22].

Hemograma electrónico

En los hemogramas electrónicos o derivados de los autoanalizadores de hematología, el estudio del extendido de sangre periférica depende del tipo de hemograma y de los resultados de éste, como se analizará a continuación.

Hemograma tipo III

En los hemogramas tipo III, de acuerdo con la Sociedad Colombiana de Patología Clínica [19] y el Ministerio de Protección Social [18], el instrumento entrega los parámetros básicos como la hemoglobina, el hematocrito, el recuento de eritrocitos, los índices eritrocitarios (volumen cor-

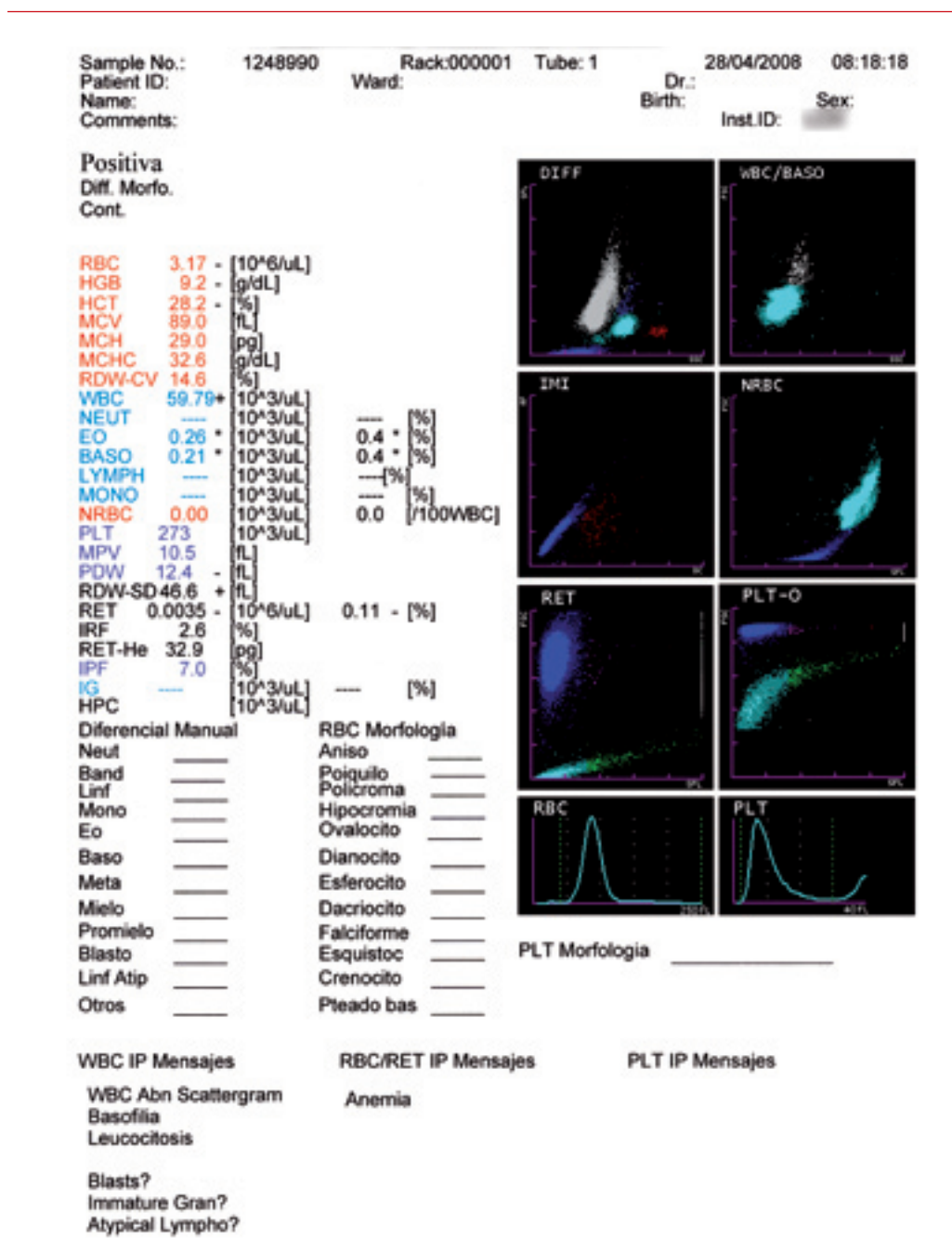


Figura 4. Facsímil de un hemograma tipo VI. Se presenta el informe que el autoanalizador de hematología entrega para que el bacteriólogo analice. En el documento se identifican los siguientes grupos: (1) resultados del análisis, (2) dispersograma del diferencial (DIFF), (3) dispersograma de leucocitos y basófilos (WBC/BASO), (4) dispersograma de células mieloides inmaduras (IMI), (5) dispersograma de eritrocitos nucleados (NRBC), (6) dispersograma de reticulocitos (RET), (7) dispersograma de plaquetas ópticas (PLT-O), (8) histograma de hematíes o eritrocitos (RBC), (9) histograma de plaquetas (PLT), (10) sistema de avisos interpretativos de leucocitos (WBC), (11) sistema de avisos interpretativos de hematíes y reticulocitos (RBC, RET), y (12) sistema de avisos interpretativos de plaquetas (PLT). En este caso el laboratorio clínico, mediante el extendido de sangre periférica que el instrumento hace y colorea, procede a verificar las alarmas y generar un informe transparente para el médico. Fuente: hoja de trabajo de un laboratorio clínico privado de Medellín, Colombia.

puscular medio, hemoglobina corpuscular media, concentración de la hemoglobina corpuscular media), el recuento total de leucocitos y en algunos instrumentos, como un parámetro opcional, el recuento total de plaquetas [23], pero no da ninguna información sobre la morfología de la sangre ni mucho menos sobre el recuento diferencial de leucocitos, parámetros que necesariamente deben ser obtenidos mediante el estudio cuidadoso del extendido de sangre periférica [21, 22].

Dentro de este grupo de autoanalizadores están, a modo de ejemplo, el Sysmex CC-700 [24], el Sysmex CC-800 [25], el Sysmex M-2000 [24], el Sysmex E-4000 [26] y el Sysmex E-5000 [27] de TOA Medical Electronics, el ZF6 [28] y el Modelo S de Coulter [29, 30], el SMA-4 [31] y SMA-4A y el H6000 [32] de Technicon [30], el Celloscope 401 [33] y el Celloscope 421 [34] y el Cell Dyn 900 [28] de Sequoia-Turner, entre otros.

Hemograma tipo IV

En los hemogramas tipo IV, de acuerdo con la Sociedad Colombiana de Patología Clínica [19] y el Ministerio de Protección Social [18], como en el caso anterior, el instrumento entrega los

ESTUDIOS Y PARAMETROS	RESULTADO	VALOR DE REFERENCIA
HEMOGRAMA TIPO VI		
Parámetros eritrocitarios:		
Glóbulos rojos (en millones)	4,6 por μ L	4,2 a 5,4 por μ L
Hemoglobina	9,0 g/dL	** 12,0 a 16,0 g/dL
Hematocrito	32,4 %	** 38,0 a 48,0 %
Promedios eritrocitarios (corpusculares de Wintrobe):		
· Volumen Corpuscular Medio VCM	69,2 fL	** 86,0 a 96,0 fL
· Hemoglobina Corpuscular Media HCM	19,2 pg	** 25,0 a 31,0 pg
· Concentración Media de la Hemoglobina Corpuscular CMHC	27,8 g/dL	** 32,0 a 38,0 g/dL
Coefficiente de variación del ancho de distribución de los eritrocitos	17,4 %	** 11,5 a 15,1 %
Parámetros leucocitarios:		
Recuento de leucocitos	7.730 por μ L	4.500 a 11.000 por μ L
Recuento diferencial (absoluto) de leucocitos		
· Polimorfo-nucleares neutrófilos	4.580 por μ L	1.500 a 8.000 por μ L
· Eosinófilos	110 por μ L	40 a 500 por μ L
· Basófilos	40 por μ L	0 a 100 por μ L
· Linfocitos	2.370 por μ L	1.500 a 4.000 por μ L
· Monocitos	620 por μ L	30 a 900 por μ L
Parámetros plaquetarios:		
Recuento de plaquetas (en miles)	401 por μ L	150 a 500 por μ L
Volumen medio plaquetario VMP	9,9 fL	6,5 a 13,5 fL
Ancho de distribución de las plaquetas ADP	11,8 %	15,4 a 16,8 %
Morfología de sangre periférica:		
Anormalidades en la morfología de los glóbulos rojos:		
· Anisocitosis (diferencias en los tamaños)	++	Negativa
· Poiquilocitosis (diferencias en las formas)	++	Negativa
· Policromatofilia	+	Negativa
· Hipocromia	+++	Negativa
· Ovalocitos	+	Negativos
· Células en gotera (dacriocitos)	+	Negativas
Morfología leucocitaria dentro de límites normales.		
Morfología plaquetaria dentro de límites normales		
Nuevos parámetros del hemograma de cuarta generación (tipo VI)		
Desviación estándar del ancho de distribución de los eritrocitos	44,0 fL	35,1 a 46,3 fL
Recuento porcentual de reticulocitos	0,9 %	0,5 a 2,0 %
Recuento total de reticulocitos (en miles)	44 por μ L	30 a 70 por μ L
Fracción de reticulocitos inmaduros	20,5 %	** 3,0 a 15,9 %
Hemoglobina reticulocitaria	21,2 pg	** 24,1 a 35,8 pg
Plaquetas reticuladas (plaquetas inmaduras)	3,1 %	1,1 a 6,1 %

Figura 5. Facsímil de un informe de un hemograma tipo VI. Se presenta el informe final de un hemograma organizado de acuerdo con los parámetros analizados y completamente transparentes para el médico. Fuente: historia clínica de un paciente de la consulta del autor.

parámetros básicos como la hemoglobina, el hematocrito, el recuento de eritrocitos, los índices eritrocitarios (volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media, concentración de la hemoglobina corpuscular media), el recuento total de leucocitos y el recuento total de plaquetas. Además, incluye nuevos parámetros como el ancho de distribución de los eritrocitos [35] y un recuento diferencial de leucocitos básico, conocido como de tres partes, debido a que agrupa los leucocitos, de acuerdo con el tamaño, en tres clases de células: linfocitos, células mixtas (en donde se incluyen monocitos, polimorfonucleares eosinófilos y polimorfonucleares basófilos) y polimorfonucleares neutrófilos [36-39]. Cuando el laboratorio clínico utiliza este tipo de autoanalizador de hematología debe incluir en todos los hemogramas que realiza de rutina extendidos de sangre periférica para observar la morfología de las diferentes series (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) y hacer el recuento diferencial de leucocitos, esto es de cinco partes (polimorfonucleares neutrófilos, polimorfonucleares eosinófilos, polimorfonucleares basófilos, linfocitos y monocitos) [22].

Dentro de este grupo de autoanalizadores están, a modo de ejemplo, el Sysmex poch-100i [40], el Sysmex CC-800 [25], el Sysmex M-2000 [24] y el E-5000 [41] de TOA Medical Electronics, el Hematrack [42] y el Coulter S Plus IV [36, 43] de Coulter, entre otros.

Hemograma tipo V

En los hemogramas tipo V, de acuerdo con la Sociedad Colombiana de Patología Clínica [19], como en los casos anteriores, el instrumento entrega los parámetros básicos como la hemoglobina, el hematocrito, el recuento de eritrocitos, los índices eritrocitarios (volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media y concentración de la hemoglobina corpuscular media), el recuento total de leucocitos y el recuento total de plaquetas. Además, incluye nuevos parámetros como el ancho de distribución de los eritrocitos, el volumen medio plaquetario, el ancho de distribución de las plaquetas y el plaquetocrito, y entrega un recuento diferencial de leucocitos de cinco partes, en donde se incluyen polimorfonucleares neutrófilos, polimorfonucleares eosinófilos, polimorfonucleares basófilos, linfocitos y monocitos [44-46]. La ventaja de estos autoanalizadores, con respecto a los anteriores, radica en un software robusto que mediante algoritmos, de acuerdo con los resultados y las anormalidades cuantitativas y cualitativas, clasifica los hemogramas en dos grandes grupos:

1. Normales, aquellos en donde el instrumento no encuentra ninguna alteración o señal de alarma y en los cuales no es necesario hacer estudio de sangre periférica complementario, a no ser que se tenga una indicación específica como la presencia de organomegalias (adenopatías, esplenomegalia, hepatomegalia), debido a que la sensibilidad y especificidad de los procedimientos manuales son mucho más bajas que en los hemogramas derivados de estos autoanalizadores, como claramente se ha demostrado [47, 48].
2. Anormales, aquellos en donde el instrumento encuentra (a) alteraciones en los parámetros cuantitativos, (b) alteraciones cualitativas y (c) alteraciones cuantitativas y cualitativas, en los cuales, en todos los casos, de rutina, es necesario hacer el estudio complementario del extendido de sangre periférica [22].

Dentro de este grupo de autoanalizadores están, a modo de ejemplo, el Sysmex NE-8000 [44, 49], el Sysmex SE-9000 [50] y el Sysmex SE-9500 [51] de TOA Medical Electronics, el MAXM [52] y el Gen-S, el STKR [53] de Coulter, el Cell-Dyn 1000 [54] y el Cell Dyn 3500 [55] de Abbott Diagnostics, y el Advia 120 [56-58] de Bayer, entre otros.

Hemograma tipo VI

En los hemogramas tipo VI, de acuerdo con la Sociedad Colombiana de Patología Clínica [19], igual que en los otros hemogramas electrónicos, el instrumento entrega los parámetros

básicos como la hemoglobina, el hematocrito, el recuento de eritrocitos, los índices eritrocitarios (volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media y concentración de la hemoglobina corpuscular media), el recuento total de leucocitos y el recuento total de plaquetas. Además de que incluye los nuevos parámetros que comparte con el hemograma tipo V, como el ancho de distribución de los eritrocitos, el volumen medio plaquetario, el ancho de distribución de las plaquetas, el plaquetocrito y el recuento diferencial de leucocitos de cinco partes, en donde se incluyen polimorfonucleares neutrófilos, polimorfonucleares eosinófilos, polimorfonucleares basófilos, linfocitos y monocitos, el hemograma tipo VI, entrega otros nuevos parámetros de utilidad clínica [4] como el recuento de reticulocitos, el índice de maduración reticulocitaria [59], la hemoglobina reticulocitaria [60, 61], el recuento de granulocitos inmaduros [62], el recuento de células progenitoras (CD34) [63-65], el recuento de eritroblastos [66] (cuando están presentes), y el índice de plaquetas inmaduras, también conocidas como plaquetas reticuladas [67-70]. Además, detecta y señala con alarmas la presencia de hemoparásitos [71, 72] lo cual es de gran importancia en las regiones en donde la malaria es endémica. El manejo del estudio de sangre periférica es similar al del hemograma tipo V, previamente analizado.

Dentro de este grupo de autoanalizadores están, a modo de ejemplo, el Sysmex XT-2000i [73], el Sysmex SE 9500 [56] y el Sysmex XE-2100 [57, 74] de TOA Medical Electronics, el Abx

Tabla 1. Posibles razones por las cuales el médico expresamente solicita revisar el extendido de sangre periférica [77]

Alteraciones cuantitativas

Confirmar un recuento bajo de plaquetas

Tener un recuento diferencial de leucocitos manual o confirmar las poblaciones de leucocitos generadas por un autoanalizador de hematología

Cuando se sospechan resultados espurios derivados del autoanalizador de hematología

Alteraciones cualitativas

Diagnosticar o descartar una neoplasia hematológica, en particular una leucemia

Diagnosticar o descartar desórdenes relacionados con las células madre

Diagnosticar o descartar enfermedades mieloproliferativas crónicas

Diagnosticar o descartar síndromes mielodisplásicos

Diagnosticar o descartar desórdenes hereditarios como la anomalía de May-Heglin

Alteraciones cuantitativas y cualitativas

Evaluación de citopenias, incluidas la anemia, la leucopenia y la trombocitopenia, solas o en sus diferentes combinaciones

Evaluar y caracterizar anemias adquiridas como las anemias hemolíticas, las relacionadas con enfermedades hepáticas y las enfermedades renales

Diagnosticar o descartar la hemoglobinuria paroxística nocturna

Diagnosticar o descartar las discrasias de células plasmáticas

Diagnosticar o descartar enfermedades plaquetarias, como el síndrome de Wiskott-Aldrich y el síndrome de plaqueta gris

Estudio de anemias hemolíticas hereditarias

Hemoglobinopatías y síndromes talasémicos

Deficiencias enzimáticas, como la deficiencia de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

Defectos de membrana de los eritrocitos, como la esferocitosis hereditaria

Otras indicaciones

Diagnosticar o descartar hemoparásitos

Sospecha de malignidad

Pentra 120 [56] de Abx Horiba, el LH 750 [57] de Beckman Coulter, el Cell Dyn 4000 [56, 75] y el Cell Dyn Sapphire [76] de Abbott Diagnostics, entre otros.

Indicaciones para hacer el extendido de sangre periférica desde la óptica del médico

Además de las indicaciones derivadas de la metodología que el laboratorio clínico utilice para hacer el hemograma, el estudio de sangre periférica puede ser solicitado en forma expresa por el médico en situaciones como las que se relacionan en la **tabla 1**, y en estos casos es ideal que los extendidos fuesen revisados por profesionales especialmente entrenados en morfología sanguínea [77].

¿Cómo hacer un extendido de sangre periférica de óptima calidad?

Dependiendo de las disponibilidades propias de cada región y de cada institución, que a su vez determinan la complejidad y el grado de instrumentación del laboratorio clínico, para hacer un extendido de sangre periférica se dispone de medios que van desde los métodos manuales hasta los altamente automatizados, que independiente de cual se utilice, si está bien estandarizado puede y debe proveer un extendido de sangre periférica de óptima calidad. En la práctica, para hacer el extendido de sangre periférica se dispone de tres metodologías: la del portaobjeto, la de la laminilla y la de capas.

Método del portaobjeto

El método del portaobjeto, también conocido como método de doble portaobjeto o método en cuña, es el más utilizado universalmente para hacer los extendidos de sangre periférica. Para lograr un extendido de sangre periférica por este método es importante tener en cuenta la muestra, el material utilizado y el procedimiento propiamente dicho. El método del portaobjeto puede hacerse por dos métodos: manual y automatizado.

Método manual del portaobjeto

El método manual del portaobjeto es más utilizado en los laboratorios clínicos. Para hacerlo en forma adecuada deben cumplirse las siguientes condiciones:

Muestra

Se puede hacer con sangre completa obtenida por punción digital o con sangre anticoagulada con EDTA (tubo con tapa lila para hemograma) [78]. Las muestras con heparina no son adecuadas para hacer el extendido de sangre periférica porque frecuentemente forma pequeños coágulos de plaquetas que interfieren con el análisis de la morfología plaquetaria y porque interfiere con la coloración, dando un fondo azul púrpura [79].

Material

Para lograr extendidos de sangre periférica de óptima calidad es indispensable utilizar portaobjetos de 75 x 25 x 1 mm, nuevos, de buena calidad, no los más baratos del mercado, limpios y libres de polvo y de grasa y por ningún motivo, reutilizados. Además, se requiere de portaobjetos extensores, romos e idealmente más estrechos que los utilizados para el extendido de la sangre.

Procedimiento

Los pasos a seguir en el método del portaobjeto para hacer el extendido de sangre periférica son los siguientes:

1. Colocar el portaobjeto en donde se planea hacer el extendido sobre una superficie plana, si la persona que va a hacer el procedimiento es diestra, con la gota de sangre al lado derecho y si es zurda, con la gota de sangre al lado izquierdo.
2. Colocar una pequeña gota, ya sea de la punción directa del dedo o del tubo con anticoagulante, de 2 a 3 mm de diámetro (0,05 mL), de sangre bien mezclada (10 inversiones manuales o 2 minutos en un homogenizador), a 1 cm de un extremo del portaobjetos. Si se emplean portaobjetos de extremo esmerilado o espacio reservado para marcarlo, la sangre se coloca cerca de éste, como se muestra en la **figura 6A**.
3. Con el pulgar y el índice de la mano derecha sujetar el segundo portaobjetos, también conocido como portaobjetos extensor, contra la superficie del primer portaobjeto con un ángulo de 30° a 45°, como se muestra en la **figura 6B**.
4. Deslizar el portaobjetos de empuje hacia atrás, hacia la gota de sangre. Permitir que la gota se extienda hasta tres cuartas partes del bisel del portaobjetos de empuje. Procurar que la sangre se extienda hasta los bordes del portaobjetos extensor, como se muestra en la **figura 6C**.
5. Empujar rápidamente el portaobjetos extensor hacia delante (lejos de la gota), como se muestra en la **figura 6D**. Este movimiento debe ser suave y continuo hasta el extremo del portaobjetos. El portaobjetos extensor deberá estar limpio y seco, e idealmente deberá ser menos ancho que el primer portaobjetos, como se visualiza en las **figuras 6B, 6C y 6D**, para evitar que la muestra se desborde y poder examinar con mayor facilidad los bordes en el microscopio.
6. Permitir que el extendido se seque al aire antes de colorearlo. Se puede abanicar en el aire para que se seque en menos tiempo.
7. Marcar el portaobjetos con un lápiz apropiado. La identificación debe ser en el extremo grueso (o el esmerilado) del portaobjetos.

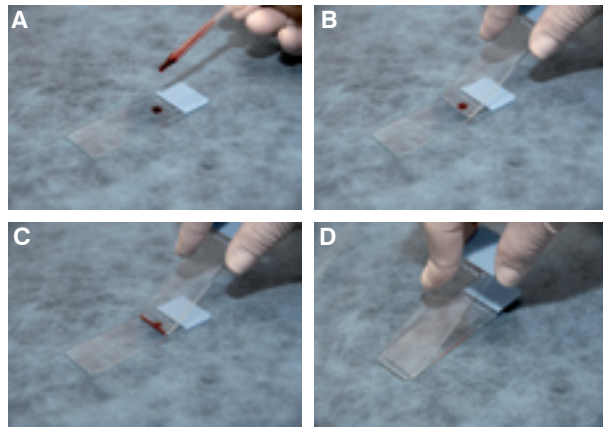


Figura 6. Extendido de sangre periférica por el método del portaobjeto. A: colocación de la gota de sangre en el portaobjeto; B: colocación del portaobjeto extensor; C: desplazamiento del portaobjeto extensor, hacia la derecha, en búsqueda de la gota de sangre; D: desplazamiento del portaobjeto extensor hacia la izquierda para hacer el extendido de sangre periférica.

Método automatizado del portaobjeto

Una de las características más importantes del método del portaobjeto es la posibilidad de ser automatizado. Los extendidos de sangre periférica se pueden automatizar en forma indepen-

diente o incorporados a los autoanalizadores de hematología. En la práctica, se presentan dos alternativas:

- La automatización independiente se basa en el uso de dispositivos que mecanizan los pasos del extendido de sangre periférica convencional. En el mercado del laboratorio clínico se pueden obtener instrumentos como Hemaprep® (SmithKline/Beecham) y el Autoprep® (Sedona Lab Products), pero ninguno de ellos se consigue localmente. Los aspectos relacionados con el procedimiento se ciñen a seguir las instrucciones del instrumento utilizado. En la **figura 7** se muestra uno de estos instrumentos.

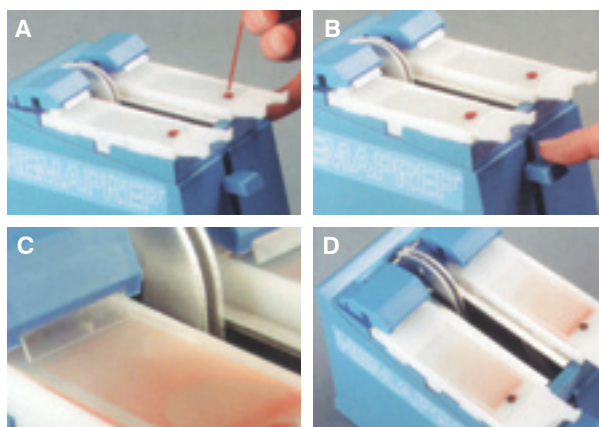


Figura 7. Extendido de sangre periférica por el método del portaobjeto con instrumento manual. Para hacer el extendido de sangre periférica se muestra un extensor de placas de la marca Hemaprep®. A: colocación de la gota de sangre en el portaobjeto; B: colocación del portaobjeto extensor; C: desplazamiento del portaobjeto extensor; D: extendidos de sangre periférica listos para ser coloreados. Cortesía de SmithKline/Beecham.

- La automatización incorporada se basa en acoplar al autoanalizador de hematología, usualmente a los de gama alta, un dispositivo completo que hace y colorea los extendidos de sangre periférica. Estos instrumentos realizan los extendidos de sangre periférica a partir de muestras preseleccionadas de acuerdo con el software “que determina cuándo” es necesario o no es necesario realizar estudio manual del extendido y en este caso “procede a hacerlo”. El método se basa en el sistema manual, previamente descrito, que desplaza un portaobjetos esmerilado sobre la superficie de otro portaobjeto. Con estos instrumentos, la calidad de los extendidos y las coloraciones son óptimas, y la individualización con relación al hematocrito de cada extendido permite placas con un grosor estándar. En la **figura 8** se muestra uno de los extensores-coloreadores recientemente introducido al mercado nacional del laboratorio clínico: el SP-1000i® incorporado al autoanalizador de hematología XE-Alpha® de Sysmex. Los aspectos relacionados con el procedimiento se ciñen a seguir las instrucciones del instrumento utilizado [80], aspectos que pueden variar de un instrumento a otro.

Ventajas y desventajas de los métodos automatizados

Cuando las placas de los extendidos de sangre periférica son marcadas automáticamente con la información registrada en el computador central del laboratorio se reducen significativamente los errores inherentes a los procedimientos manuales, además, los errores por defectos de la preparación del extendido de sangre periférica y la coloración de éste son significativamente menores cuando estos procedimientos se hacen de rutina con métodos automatizados, que usualmente están sometidos a mejor control de calidad que cuando se hacen con métodos manuales [81]. La única desventaja es el costo.

¿Cómo saber si el extendido por el método del portaobjeto es de óptima calidad?

Un extendido de sangre periférica por el método del portaobjeto de óptima calidad, independiente de cómo se haga, debe tener las siguientes características:

1. El extendido debe progresar desde un aspecto grueso en el punto de origen (cabeza del extendido), a un aspecto delgado, con un borde uniforme en el punto final (cola del extendido).
2. El extendido en todo su trayecto no debe tocar los bordes externos del portaobjetos, ni se debe desbordar por los lados o extremos del mismo.
3. El extendido no debe tener ondas ni huecos, estrías, crestas ni depresiones, lo cual llevaría a resultados espurios, principalmente en el recuento diferencial de leucocitos.
4. Si la cantidad de sangre y la distribución de ésta son las adecuadas, el extendido debe ocupar dos tercios de la longitud del portaobjetos, esto es de 3 a 4 cm.

¿Cuáles son las causas por las cuales el extendido por el método del portaobjeto puede ser deficiente?

Son muchas las causas por la cuales un extendido de sangre periférica puede ser deficiente para su estudio, circunstancias que los profesionales del laboratorio clínico deben controlar. Dentro de estas circunstancias las principales son las siguientes:

1. Cuando el extendido se hace con sangre con anticoagulante (usualmente con EDTA) y la muestra se almacena por períodos prolongados (más de dos horas) [79] o en condiciones inadecuadas. Como resultado de esta circunstancia, se puede presentar distorsión celular.
2. Cuando el extendido se hace con sangre sin anticoagulante y éste no se extiende inmediatamente después de colocar la gota de sangre en el portaobjetos. Si este proceso se retrasa, hasta cuando se inician los procesos de coagulación, las células más grandes, como los neutrófilos y los monocitos, se localizan de manera desproporcionada en el extremo delgado del extendido, dando resultados espurios en el recuento diferencial de leucocitos.
3. Cuando se utilizan portaobjetos sucios o de mala calidad. Los portaobjetos deben estar libres de polvo y manchas de grasa. En algunos laboratorios clínicos con buenas prácticas de laboratorio limpian con alcohol los portaobjetos para hacer los extendidos de sangre periférica de rutina.
4. Cuando el tamaño de la gota de sangre es inapropiado. Una gota demasiado grande produce un extendido grueso y largo. Una gota demasiado pequeña produce un extendido delgado y corto, insuficiente para un estudio adecuado.
5. Cuando el ángulo del portaobjetos de empuje es incorrecto. Mientras menor sea el ángulo del portaobjetos de empuje, el

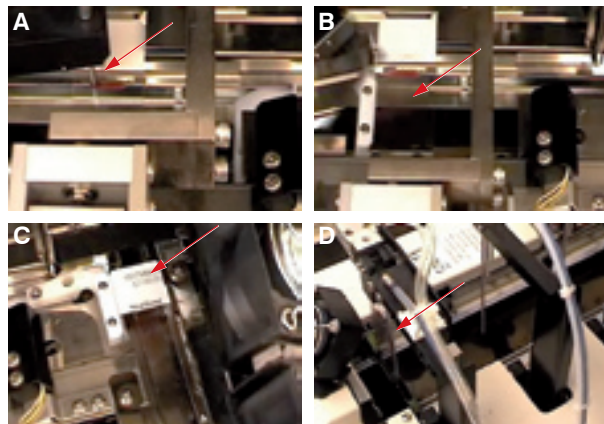


Figura 8. Aditamento incorporado a un autoanalizador de hematología, XE-Alpha® (XE-2100/sp-1000i) de Sysmex, para el extendido y coloración automática de la sangre periférica. A: colocación de la gota de sangre en el portaobjeto; B: desplazamiento del portaobjeto extensor para hacer el extendido de sangre periférica; C: rotulación de las placas con las muestras; D: coloración de los extendidos de sangre periférica. Cortesía de Sysmex®.

extendido será más largo y delgado y mientras mayor sea, el extendido será más corto y grueso.

6. Cuando la velocidad del movimiento de empuje es inapropiada. Mientras más lento sea el empuje de la gota de sangre, se producen más irregularidades en el extendido y más se afecta la distribución de las células en el extendido, dando resultados espurios.
7. Cuando la presión es inadecuada. Mientras mayor sea la presión, más delgado será el extendido.
8. Cuando en el medio ambiente del laboratorio clínico hay problemas con la humedad y temperatura. La humedad elevada puede hacer que las muestras se sequen con mayor lentitud y como consecuencia se produce distorsión de los eritrocitos.

Ventajas y desventajas del método del portaobjeto

El método del portaobjeto es el método más conocido y utilizado universalmente en los laboratorios clínicos y el que mejor se maneja por esta circunstancia. La técnica se domina con facilidad, los extendidos son menos frágiles que los que utilizan el método de la laminilla y se pueden manipular con mayor facilidad. Dentro de las desventajas está la falta de uniformidad en la distribución de los leucocitos que se logra con los métodos alternativos, situación que introduce un índice de mayor variabilidad en los recuentos diferenciales manuales [48, 82].

Método de la laminilla

El método de la laminilla, también conocido como método del cubreobjeto, corresponde a una variable “mejorada” del método del portaobjeto, en donde el extendido en vez de hacerse sobre un portaobjeto estándar, se hace sobre laminillas o cubreobjetos.

Como en el método del portaobjeto, para lograr un extendido de sangre periférica de óptima calidad por el método de laminilla, es importante tener en cuenta la muestra, el material utilizado y el procedimiento propiamente dicho.

Muestra

Se puede hacer con sangre completa obtenida por punción digital o con sangre anticoagulada con EDTA (tubo con tapa lila para hemograma) [78]. Las muestras con heparina no son adecuadas para hacer el extendido de sangre periférica porque frecuentemente forma pequeños coágulos de plaquetas que interfieren con el análisis de la morfología plaquetaria y porque interfiere con la coloración, dando un fondo azul púrpura [79].

Material

Para lograr extendidos de sangre periférica de óptima calidad es indispensable utilizar laminillas de 22 mm, nuevas, de buena calidad, no las más baratas del mercado, limpias, libres de polvo y de grasa; y por ningún motivo, reutilizadas.

Procedimiento

Los pasos a seguir en el método de la laminilla para hacer el extendido de sangre periférica son los siguientes:

1. Tomar por una de sus esquinas una laminilla entre los dedos pulgar e índice de la mano izquierda, o derecha cuando quien hace el extendido es zurdo. Poner en el centro de una

laminilla una pequeña gota de sangre (10 inversiones manuales o 2 minutos en un homogenizador de tubos para hematología), como se muestra en la **figura 9A**.

2. Tomar una segunda laminilla con la mano derecha por una de las esquinas y colocarla de inmediato sobre la gota de sangre en sentido diagonal, como se muestra en la **figura 9B**.

3. Permitir que la sangre se extienda por acción capilar.

4. Justo antes de que se detenga la diseminación, como se observa en la **figura 9C**, separar con suavidad y de manera uniforme los cubreobjetos en el plano horizontal, como se muestra en la **figura 9D**.

5. Colocar los extendidos en posición invertida y permitir que se sequen al aire antes de colocarlos. Se pueden abanicar en el aire para que se sequen en menos tiempo.

6. En un área gruesa del extendido, aquella que posiblemente no necesitará para la lectura microscópica, marcar suavemente la laminilla.

¿Cómo saber si el extendido por el método de la laminilla es de óptima calidad?

Un extendido de sangre periférica de óptima calidad por el método de la laminilla debe tener las siguientes características:

1. El extendido debe quedar como una mancha uniformemente distribuida en el centro de cada una de las laminillas.
2. El extendido en toda su extensión no debe tocar los bordes externos de las laminillas, ni se debe desbordar por los lados de las mismas.
3. El extendido se debe observar uniforme, sin ondas, huecos, estrías, crestas ni depresiones, lo cual llevaría a resultados espurios en el recuento diferencial de leucocitos.
4. Si la cantidad de sangre y la distribución de ésta son las adecuadas, el extendido debe ocupar dos tercios de la superficie de las laminillas.

¿Cuáles son las causas por las cuales el extendido por el método de la laminilla puede ser deficiente?

Son muchas las causas por las cuales un extendido de sangre periférica puede ser deficiente para su estudio, situaciones que los profesionales del laboratorio clínico deben estar en condicio-

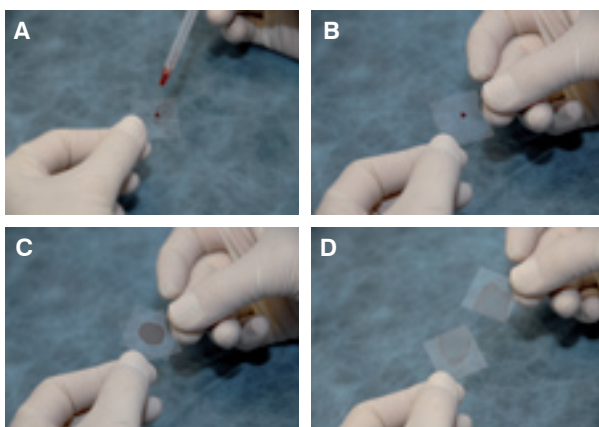


Figura 9. Extendido de sangre periférica por el método de laminilla. A: colocación de la gota de sangre en la laminilla; B: colocación de la laminilla extensora; C: difusión de la muestra entre las laminillas; D: separación horizontal de las laminillas.

nes de controlar. Dentro de estas circunstancias, muy similar a lo que se puede presentar con el método del portaobjeto, en el método de laminilla las principales son las siguientes:

1. Cuando el extendido se hace con sangre con anticoagulante (usualmente con EDTA) y se almacena la muestra por períodos prolongados (más de dos horas) [79] o en condiciones inadecuadas, como puede suceder en los laboratorios clínicos con grandes volúmenes de trabajo o con sobrecarga de trabajo. Como resultado de esta circunstancia, se puede presentar distorsión celular.
2. Cuando el extendido se hace con sangre sin anticoagulante y éste no se hace inmediatamente después de colocar la gota de sangre sobre la laminilla. Si este proceso se retrasa, hasta cuando se inician los procesos de coagulación, las células más grandes, como los neutrófilos y los monocitos, se localizan de manera desproporcionada y cuando se examinan al microscopio dan resultados espurios en el recuento diferencial de leucocitos.
3. Cuando se utilizan laminillas sucias o de mala calidad. Las laminillas deben estar libres de polvo y manchas de grasa. En algunos laboratorios clínicos con buenas prácticas de laboratorio, se limpian con alcohol las laminillas para hacer los extendidos de sangre periférica de rutina. No se deben utilizar laminillas extremadamente delgadas porque son muy frágiles y se quiebran durante el procedimiento, lo cual constituye un peligro para los profesionales del laboratorio [79].
4. Cuando el tamaño de la gota de sangre es inapropiado. Una gota demasiado grande, la que usualmente desborda la capacidad de las laminillas, produce un extendido grueso y de pésima calidad en donde es imposible individualizar las células para el análisis de ellas. Una gota demasiado pequeña produce un extendido delgado e insuficiente para un estudio adecuado.
5. Cuando el desplazamiento de las laminillas no es adecuado. De ahí la mayor dificultad del método.
6. Cuando la presión aplicada entre las laminillas es inadecuada, mientras mayor sea la presión más delgado será el extendido y, a la inversa, mientras menor sea la presión más grueso será el extendido.
7. Cuando en el medio ambiente del laboratorio clínico hay problemas con la humedad. La humedad elevada puede hacer que las laminillas se sequen con mayor lentitud y como consecuencia se produce distorsión de los eritrocitos.

Ventajas y desventajas del método de la laminilla

Con el método de la laminilla se logran extendidos de sangre periférica de óptima calidad pero se requiere experiencia para depurar y poner a punto la técnica, motivo por el cual sólo se utiliza en algunos servicios o laboratorios clínicos especializados en hematología. Con este método se obtiene una buena distribución de los leucocitos en todas las partes de la preparación. A causa del menor tamaño de la muestra, se cuentan 50 leucocitos por cada cubreobjetos. Además de las cualidades antes descritas, que a su vez se convierten en inconvenientes para muchos laboratorios clínicos, sobre todo los de grandes volúmenes de pacientes, es más costoso que el método del portaobjeto, es más exigente en relación con la coloración, las laminillas son muchísimo más frágiles que los portaobjetos y, hasta el momento, no ha sido posible automatizarlo. Finalmente, el *"Cytometry Panel of the International Council for Standardization of Hematology (ICSH)"*, debido a que las laminillas no pueden ser marcadas sin que se dañe el extendido y que la fragilidad del material puede representar un riesgo biológico para el personal

del laboratorio, no lo recomienda y va más allá: lo considera obsoleto y en consecuencia no debería usarse [79].

Extendido de sangre periférica por el método de capas

Este método, también conocido como de spinner, consiste en utilizar una fuerza centrífuga para distribuir la sangre sobre la superficie de un portaobjeto [83-85]. Con este método se consigue una película de sangre muy delgada, por lo que también se le denomina monocapa, en la que es posible observar una distribución de los leucocitos muy uniforme haciendo innecesaria la selección de un área especial para hacer el recuento diferencial de leucocitos [83]. El sistema consta de una centrífuga especial, y unos receptáculos especiales para los portaobjetos, que con tan sólo dos gotas de sangre anticoagulada y en menos de tres a cinco segundos, permiten obtener extendidos de sangre periférica de óptima calidad. Esta metodología también puede ser utilizada para hacer extendidos de reticulocitos [86]. En la **figura 10A** se muestra una centrífuga para hacer extendido de sangre periférica por el método de capas y en la **figura 10B**, el aditamento para manejar la muestra.

Ventajas y desventajas del método de capas

El método de capas usa una fuerza de centrifugación para producir una sola capa de células con leucocitos y plaquetas distribuidos uniformemente [87]. El método permite manejar grandes volúmenes de muestras con extendidos óptimos en donde se minimiza el daño de la morfología celular y el procedimiento es limpio y seguro. Tiene algunas desventajas como alteraciones de los eritrocitos por la fuerza centrífuga [84]. Otra desventaja es el riesgo biológico debido a que se pueden crear aerosoles, sobre todo cuando se utilizaban sistemas antiguos que carecen de la adecuada protección, y el costo del instrumento, además de que no está disponible en el medio por falta de representación comercial.

¿Cómo hacer una coloración del extendido de sangre periférica de óptima calidad?

Además de la calidad del extendido de sangre periférica, el laboratorio clínico debe velar por la calidad de la coloración: para nada sirve un buen extendido si éste no se colorea adecuadamente. Como en la mayoría de los procedimientos en el laboratorio clínico, sólo es posible tener resultados óptimos cuando las muestras son las adecuadas y los extendidos de sangre periférica no son la excepción.

Independiente del método utilizado para hacer el extendido de sangre periférica y para colorearlo, de acuerdo con la ICSH la coloración de referencia para los extendidos de sangre periférica es la coloración de Romanowsky [88]. La coloración de Romanowsky es una mezcla que contiene azul de metileno y eosina que representa un prototipo de varias coloraciones entre las cuales sobresalen la coloración de Wright,

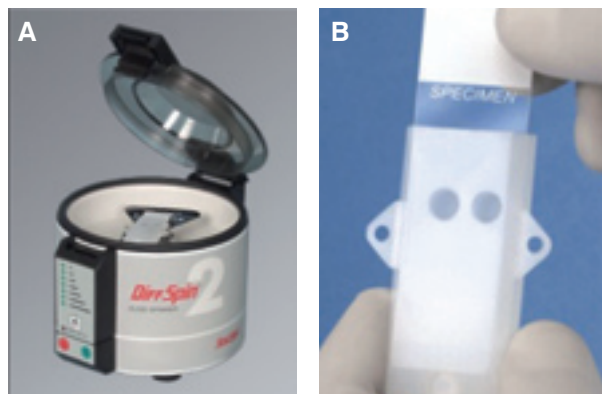


Figura 10. Extendido de sangre periférica por el método de capas. A: centrífuga utilizada para hacer el extendido de sangre periférica mediante el método de capas; B: aditamento para llevar la muestra de sangre a la centrífuga para hacer el extendido de sangre periférica. Cortesía de StatSpin DiffSpin®.



Figura 11. Instrumento para extendido y coloración de sangre periférica. Se muestra un instrumento para hacer y colorear extendidos de sangre periférica independiente del autoanalizador de hematología. Cortesía de GG&B Co, Wichita Falls, Texas.

la coloración de Giemsa, la coloración de May-Grünwald-Giemsa y la coloración de Leishman [89-91]. En nuestro medio, la más utilizada es la coloración de Wright [88].

Coloración de Wright

La coloración de Wright, por el método manual, se hace de la siguiente manera [88]:

1. Colocar los portaobjetos con el extendido de sangre periférica hacia arriba en los soportes de vidrio previamente dispuestos en la bandeja de coloración. Cuando el extendido de sangre periférica está hecho sobre laminillas, éstas se colocan sobre corchos o tapones de caucho invertidos, pegados sobre madera u otro material resistente previamente dispuesto en la bandeja de coloración.
2. Cubrir el extendido de sangre periférica con colorante de Wright y dejar en reposo por tres (3) minutos.
3. Inundar el portaobjetos o la laminilla con solución tampón sin dejar derramar el líquido por los bordes de la preparación. Cuando se utiliza laminilla se puede ayudar a mezclar el colorante con la solución tampón soplando suavemente de un lado a otro sobre la laminilla. Dejar en reposo por cinco (5) minutos.
4. Lavar los portaobjetos o las laminillas con agua corriente por 10 segundos. Con una gasa impregnada con un poco de alcohol se retira el exceso de colorante del revés y los bordes del portaobjetos. Cuando se utilizan laminillas, éstas se pueden dejar secando sobre papel de filtro y con la gasa impregnada con un poco de alcohol retirar los excesos de colorante que se depositan alrededor del corcho o tapón que las soporta.

La coloración de Wright, así como las otras coloraciones utilizadas en hematología, puede ser automatizada mediante instrumentos independientes o incorporados a los nuevos autoanalizadores de hematología.

Coloreadores de placas

Como se ha expresado, con el desarrollo tecnológico, independiente (ver **figura 11**) o como parte integral de los autoanalizadores de hematología, es posible con un alto grado de eficiencia automatizar estos procesos en el laboratorio clínico. En el mercado del laboratorio clínico, localmente, se dispone de autoanalizadores de hematología que como el XE-Alpha® de Sysmex [66, 80], que se muestra en la **figura 12**, automatizan todo el proceso del hemograma, dejando para que el bacteriólogo o profesional frente al instrumento interprete los datos cuantitativos y cualitativos como los que se visualizaron en la **figura 4** y revise las placas que entrega como se mostró en la **figura 5**.

Posibles problemas con la coloración

Una buena coloración debe mostrar un extendido de sangre periférica de color rosado. Si el extendido de sangre periférica una vez coloreado se observa azul, se deben considerar varias circunstancias: extendido de sangre periférica muy grueso, lavado insuficiente, tiempo de coloración prolongado y alcalinidad del colorante. Si la coloración queda roja puede ser por exceso de acidez en el colorante o en el agua utilizada, por presencia de humos ácidos en el colorante. Si en la coloración se observan precipitados entre las células puede ser debido a placas sucias, placas mal lavadas, a que el colorante se ha secado, posición oblicua del extendido de sangre periférica durante la coloración, polvo, incluido el procedente de guantes, precipitado sobre el extendido de sangre periférica y ambientes sucios en donde se colorean las placas, entre otras circunstancias.

Análisis del extendido de sangre periférica

Una vez que se tenga un extendido de sangre periférica de óptima calidad, debidamente coloreado, el punto final se centra en dos aspectos críticos: ¿quién y cómo analizar el extendido de sangre periférica?

¿Quién debe analizar el extendido de sangre periférica?

Para sacar el máximo provecho del examen del extendido de sangre periférica, el examen debe realizarlo personal idóneo, debidamente capacitado y preferiblemente con experiencia en morfología sanguínea [92]. Cuando en Europa y Estados Unidos sólo los laboratorios clínicos con personal capacitado y certificado pueden “leer” un extendido de sangre periférica, en nuestro



Figura 12. XE-Alpha® de Sysmex. Al lado izquierdo se observa un extensor y coloreador de placas modelo SP-1000i de Sysmex, incorporado al autoanalizador de hematología (DX-2100®) ubicado al lado derecho. Cortesía de Sysmex®.

medio, sobretudo en algunos laboratorios de grandes volúmenes, el bacteriólogo se limita a “cargar” las muestras al autoanalizador de hematología y a entregar el impreso del estudio “en bruto”, sin el más mínimo análisis de las alarmas mediante un estudio microscópico de la sangre periférica, como claramente se evidenció en los facsímiles que se reprodujeron en las **figuras 1 a 3**, en el curso de este módulo.

¿Cómo analizar el extendido de sangre periférica?

Finalmente, una vez obtenido un extendido de sangre periférica de óptima calidad, óptimamente coloreado, es indispensable que sea analizado por personal calificado, conocedor de morfología sanguínea, como claramente se evidenció en el curso de este módulo, dentro de las buenas prácticas de laboratorio y como se analizará con detenimiento en los próximos módulos.

En la **figura 13** se muestra un extendido de sangre periférica listo para ser leído en donde se delimitan algunas áreas de importancia, como la cabeza, el cuerpo y la cola del extendido, que el profesional que lee la placa debe identificar claramente. Como se esquematiza, el área en donde idealmente se debe hacer el análisis es la cola. Además, a manera de resumen, en las **figuras 14 a 21** se muestran algunos ejemplos de extendidos de sangre periférica realizados por los diferentes métodos analizados en este módulo; como claramente se demuestra en las **figuras 17, 19 y 21**, con todos los métodos es posible tener buenos resultados cuando éstos se hacen siguiendo estrictamente los procedimientos para cada uno de ellos.

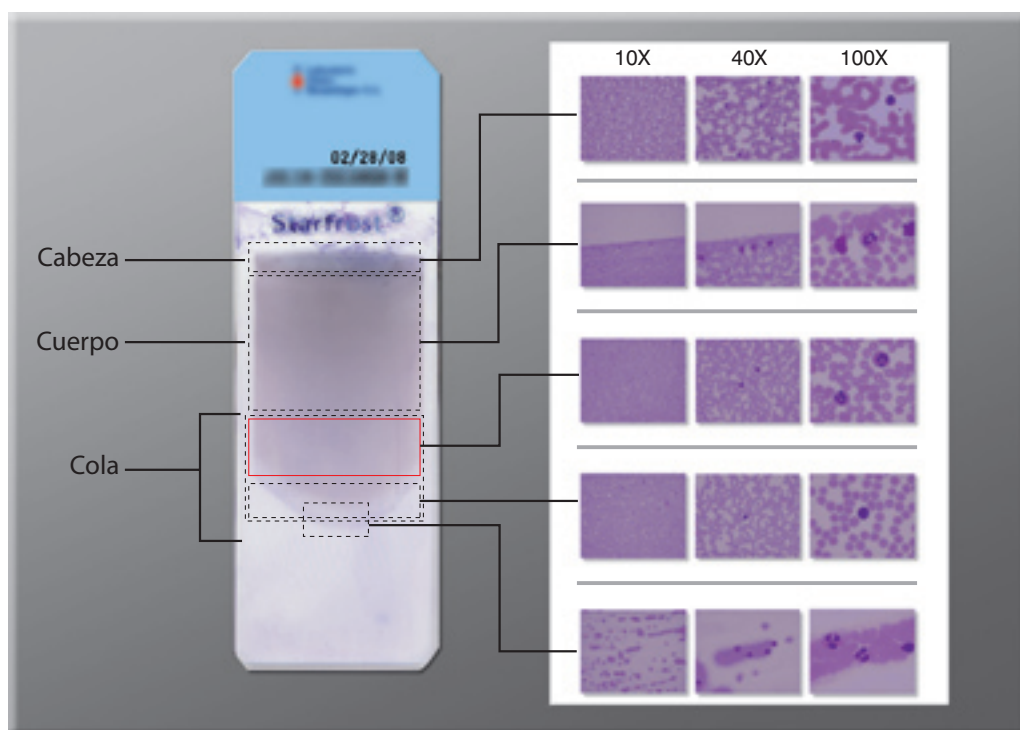


Figura 13. Extendido de sangre periférica listo para ser leído. Al lado izquierdo, sobre el portaobjeto se muestra un extendido de sangre periférica realizado por un instrumento automático incorporado al autoanalizador de hematología en donde se identifican algunas áreas de importancia: En la cola del extendido se señala con una línea roja el área en donde idealmente debe centrarse el estudio microscópico. En el lado derecho se muestran algunos aspectos microscópicos de las principales áreas del extendido de sangre periférica. Fuente: laboratorio clínico institucional del orden asistencial de la ciudad de Medellín, Colombia.

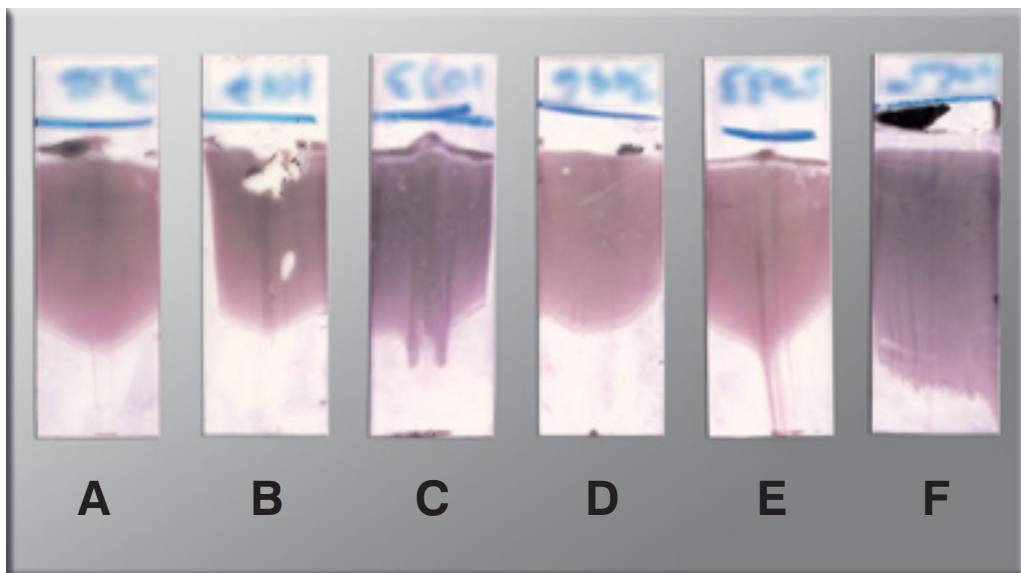


Figura 14. Extendidos de sangre periférica de mala calidad, hechos por el método del portaobjeto y coloreados por el método de Wright manual. En todas las placas se evidencia que el extendido se ha desbordado por los lados de las láminas, explicable por falta de una placa extensora adecuada. Los extendidos de sangre periférica de las láminas E y F muestran que la cola del extendido se prolonga hasta el final de la placa, sospechoso de la presencia de un pequeño coágulo o de un cuerpo extraño en la muestra. El extendido de la lámina B está pobremente fijado al portaobjeto, situación que lo lleva a un permanente deterioro. El extendido F muestra exceso de sangre que cubre más de las dos terceras partes de la lámina, como consecuencia no es posible individualizar las células al momento de hacer la observación microscópica como se observa en la **figura 15**. Además de lo anterior, es evidente que la coloración está defectuosa y que la forma de marcarlas no permite archivarlas adecuadamente. Fuente: placas procedentes de un laboratorio clínico institucional de la ciudad.

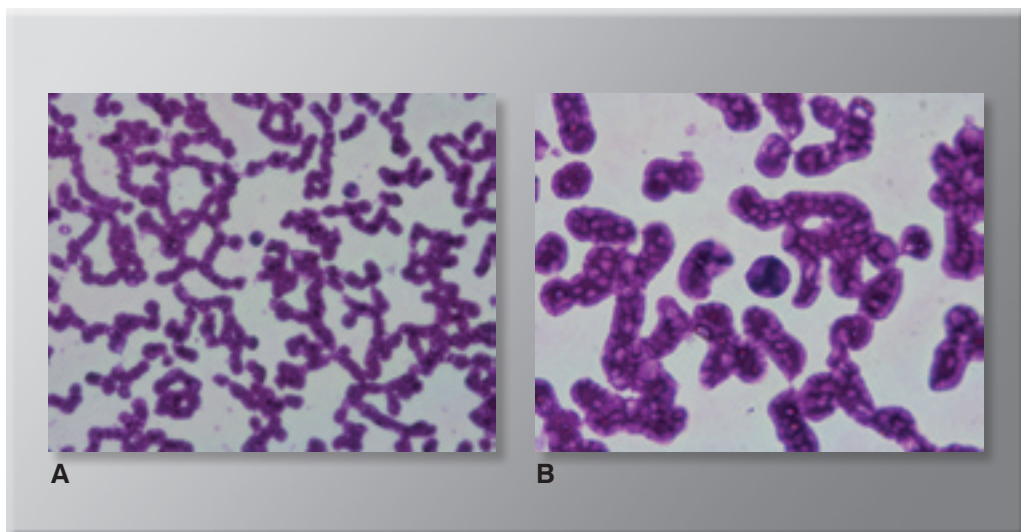


Figura 15. Observación microscópica de un extendido de sangre periférica de mala calidad, hecho por el método del portaobjeto y coloreado por el método de Wright manual. A: se observa que las células dan un aspecto de aglutinación, situación que se genera por mayor cantidad de sangre que la requerida y por aumento en el tiempo de secado del extendido de sangre periférica (400X); B: mayor aumento en donde se evidencia la imposibilidad de visualizar la morfología de los eritrocitos, no es posible visualizar correctamente las plaquetas y los leucocitos que como se observa en el centro de la microfotografía han perdido la mayoría de las características morfológicas (1000X). Salta una pregunta: ¿cómo es posible informar un estudio con la calidad de estos extendidos de sangre periférica? Fuente: placas procedentes de un laboratorio clínico institucional de la ciudad.

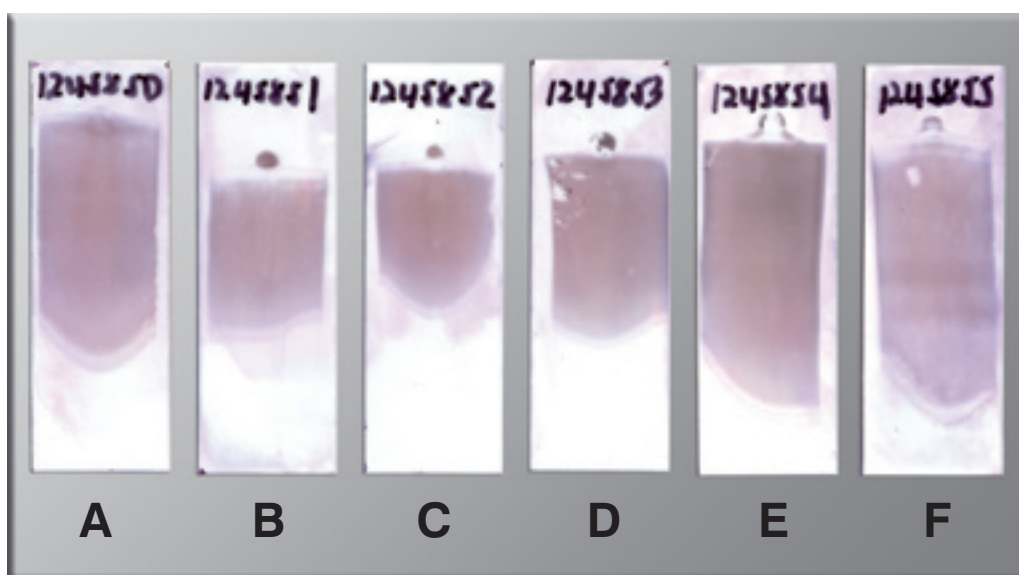


Figura 16. Extendidos de sangre periférica hechos por el método del portaobjeto y coloreados por el método de Wright manual. En contraposición a las placas de la **figura 14**, se presentan seis placas aceptablemente elaboradas por el método del portaobjeto y coloreadas manualmente por el método de Wright. Se observan algunas deficiencias, como recorrido corto (B a D), falta de fijación al portaobjeto (D) y desbordamiento en algunas partes del portaobjeto (E). La mejor placa técnicamente es la A. Fuente: laboratorio clínico privado del orden asistencial de la ciudad de Medellín, Colombia.

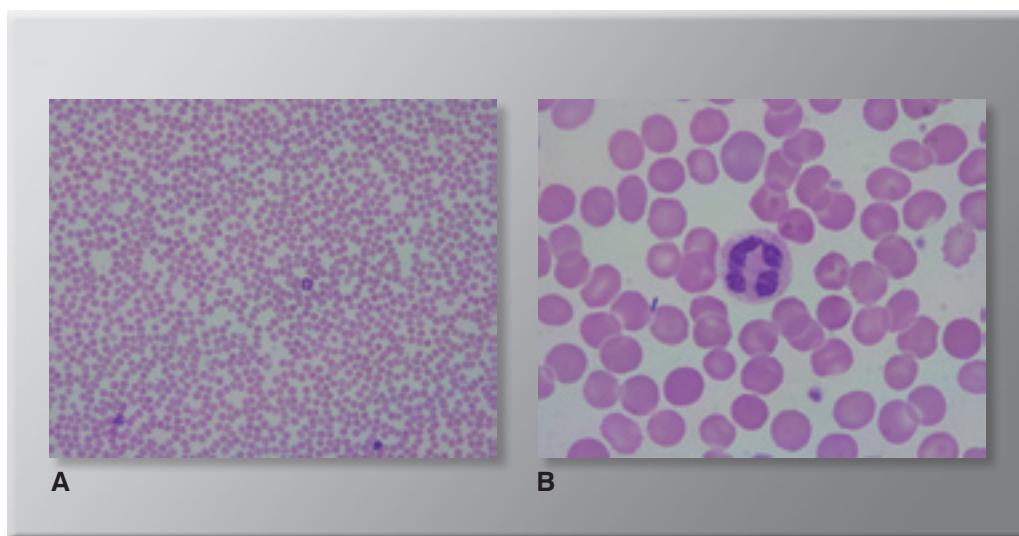


Figura 17. Observación microscópica de un extendido de sangre periférica de buena calidad hecho por el método del portaobjeto y coloreado por el método de Wright manual. A: pequeño aumento (400X) en donde es posible visualizar los diferentes componentes de la sangre en un campo apto para el estudio detallado de la morfología y el recuento diferencial de leucocitos; B: mayor aumento (1000X) en donde se evidencia la buena calidad del extendido de sangre periférica. Fuente: laboratorio clínico institucional del orden docente de la ciudad de Medellín, Colombia.

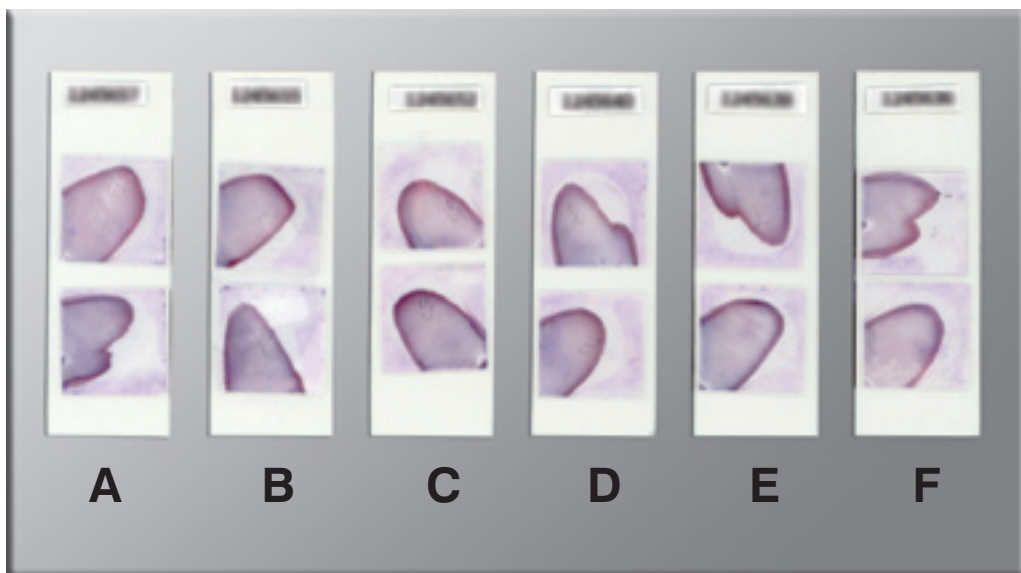


Figura 18. Extendidos de sangre periférica hechos por el método de la laminilla y coloreados por el método de Wright. Se presentan seis placas de buena calidad elaboradas por el método de la laminilla y coloreadas manualmente por el método de Wright. Fuente: laboratorio clínico institucional del orden docente de la ciudad de Medellín, Colombia.

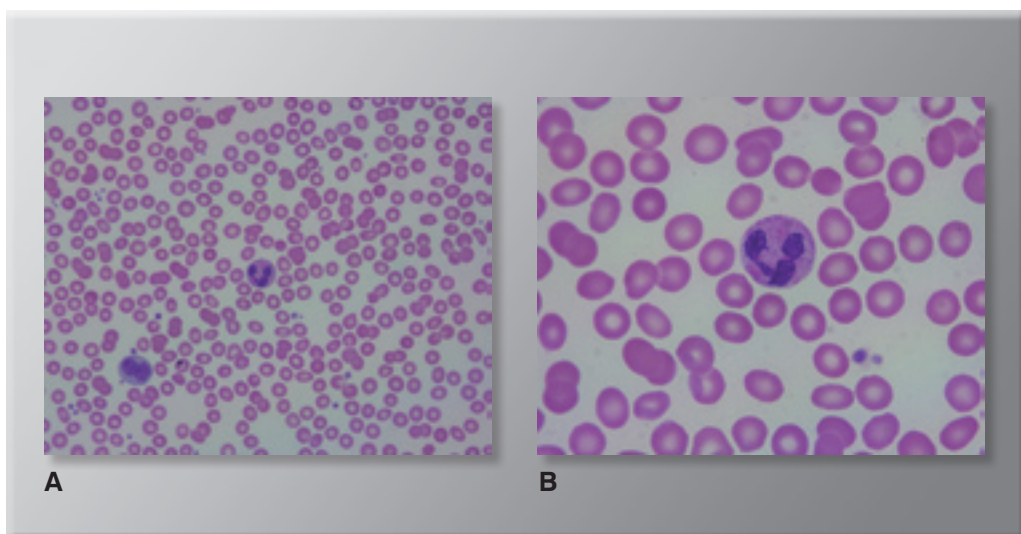


Figura 19. Observación microscópica de un extendido de sangre periférica hecho por el método de la laminilla y coloreado por el método de Wright. A: pequeño aumento (400X) en donde es posible visualizar los diferentes componentes de la sangre en un campo apto para el estudio detallado de la morfología y el recuento diferencial de leucocitos; B: mayor aumento (1000X) en donde se evidencia la buena calidad del extendido de sangre periférica. Fuente: laboratorio clínico institucional del orden docente de la ciudad de Medellín, Colombia.

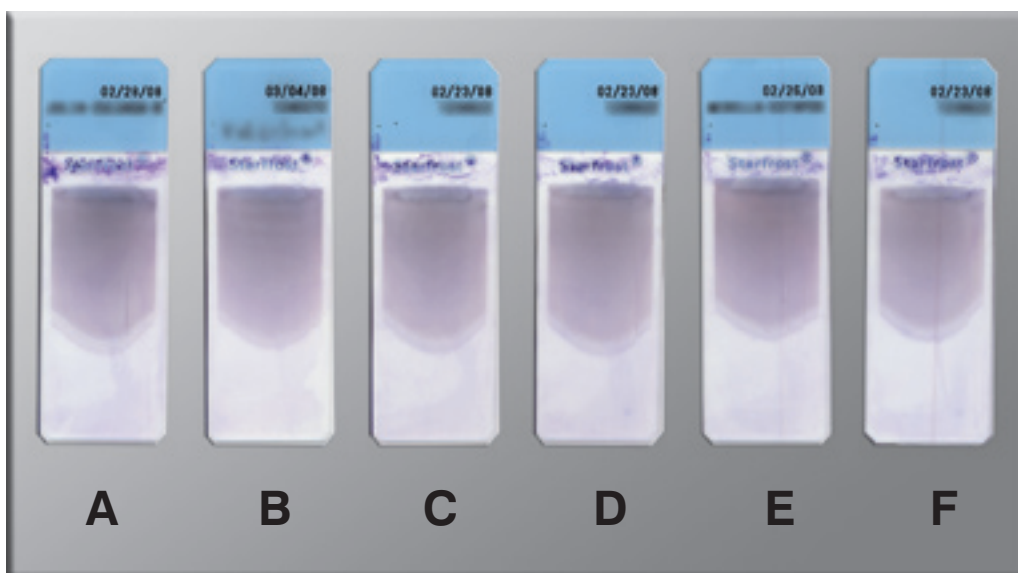


Figura 20. Extendidos de sangre periférica de buena calidad, hechos y coloreados automáticamente con un instrumento incorporado a un autoanalizador de hematología. Se presentan seis placas elaboradas y coloreadas automáticamente por el autoanalizador de hematología. Fuente: laboratorio clínico privado del orden asistencial de la ciudad de Medellín, Colombia.

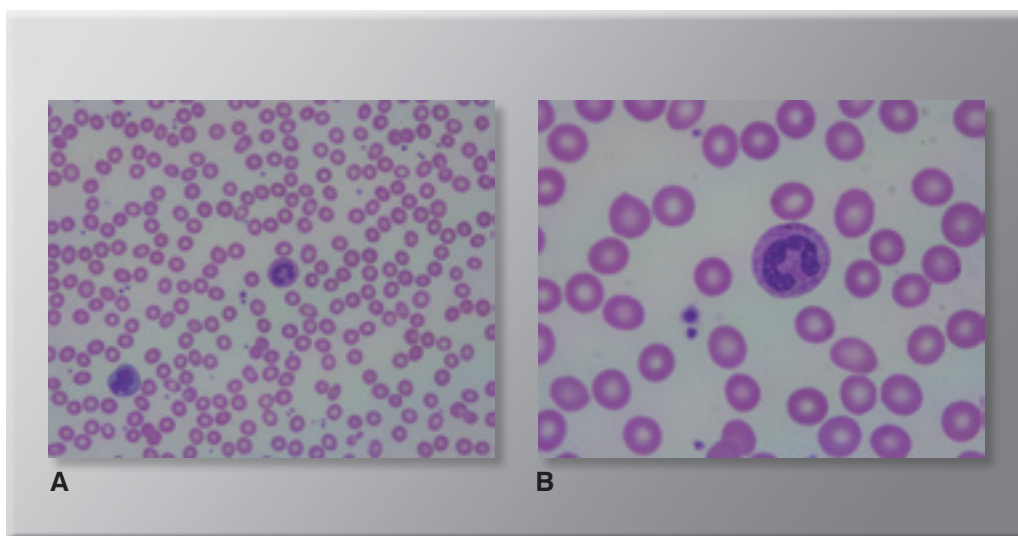


Figura 21. Observación microscópica de un extendido de sangre periférica de buena calidad, hecho y coloreado automáticamente por un autoanalizador de hematología. A: pequeño aumento (400X) en donde es posible visualizar los diferentes componentes de la sangre en un campo apta para el estudio detallado de la morfología y el recuento diferencial de leucocitos; B: mayor aumento (1000X) en donde se evidencia la calidad del extendido de sangre periférica. Fuente: laboratorio clínico privado del orden asistencial de la ciudad de Medellín, Colombia.

Conclusión

A pesar de los grandes avances tecnológicos y del desarrollo de nuevos parámetros en hematología, el extendido de sangre periférica continúa siendo la prueba reina en el diagnóstico hematológico. Por razones ajenas al objetivo de este módulo, y a la mala aplicación de la tecnología y la falta de capacitación, entre otras razones, muchos laboratorios clínicos han menospreciado el valor del extendido de sangre periférica y en consecuencia sólo se limitan a entregar como resultado el informe que “en bruto” entrega el autoanalizador de hematología, sin el más mínimo análisis del extendido de sangre periférica, aun en los casos en donde las alarmas del instrumento así lo exigen, dentro de las buenas prácticas de laboratorio y las instrucciones de las respectivas casas comerciales. Para tener un estudio de la sangre periférica que pueda ser considerado de óptima calidad, calificación que siempre será posible, necesariamente deberán confluír tres condiciones: (1) que el extendido de sangre periférica sea óptimo, (2) que la coloración sea óptima y (3) que el estudio esté bajo la responsabilidad de profesionales debidamente capacitados para resolver la “interconsulta” que genera la solicitud de un hemograma al laboratorio clínico.

Summary: Despite the huge technological advances and the development of new parameters in hematology, the blood smear remains as the “queen of assays” in the hematological diagnosis. For various reasons, out of the scope of this module, and to the misuse of technology, many laboratories have underestimated the values of the blood smear and as a result they hand the raw hematology results, as they come printed from the automatic analyzers, without an analysis of the blood smear, not even in the instances where the instrument alarm requires it, according to the good laboratory practices. In order to have an optimal analysis of the blood smear, three conditions must be met: (1) an optimal blood smear, (2) optimal staining and (3) the smear being analyzed by competent personal.

Key words: Blood smear, glass slide method, cover-slip method.

Campuzano-Maya, G. How to obtain an optimal blood smear? *Medicina & Laboratorio* 2008; 14: 125-152.

Module 4 (Hematology), number 9. Editora Médica Colombiana S.A., 2008®.

Received on January 22, 2008; accepted on February 18, 2008.

Bibliografía

1. **Coulter WH.** High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer. *Proc Natl Electronics Conf* 1956; 12: 1034-1042.
2. **Cartwright GE.** *Diagnostic Laboratory Hematology.* Grune and Stratton, New York, USA, 1963.
3. **Fossat C, David M, Harle JR, Sainty D, Horschowski N, Verdot JJ, et al.** New parameters in erythrocyte counting. Value of histograms. *Arch Pathol Lab Med* 1987; 111: 1150-1154.
4. **Briggs C, Harrison P, Grant D, Staves J, MacHlin SJ.** New quantitative parameters on a recently introduced automated blood cell counter—the XE 2100. *Clin Lab Haematol* 2000; 22: 345-350.
5. **Wiwanitkit V.** Plateletcrit, mean platelet volume, platelet distribution width: its expected values and correlation with parallel red blood cell parameters. *Clin Appl Thromb Hemost* 2004; 10: 175-178.
6. **David O, Grillo A, Ceoloni B, Cavallo F, Podda G, Biancotti PP, et al.** Analysis of red cell parameters on the Sysmex XE 2100 and ADVIA 120 in iron deficiency and in uraemic chronic disease. *Scand J Clin Lab Invest* 2006; 66: 113-120.
7. **Noronha JF, Lorand-Metze IG, Grotto HZ.** Hematopoietic progenitor cells (HPC) and immature reticulocytes evaluations in mobilization process: new parameters measured by conventional blood cell counter. *J Clin Lab Anal* 2006; 20: 149-153.
8. **Agorasti A, Trivellas T, Papadopoulos V, Konstantinidou D.** Innovative parameters RET-Y, sTfR, and sTfR-F index in patients with microcytic, hypochromic anemia. Their special value for hemoglobinopathies. *Lab Hematol* 2007; 13: 63-68.
9. **The National Committee for Clinical Laboratory Standards.** NCCLS document H20-A, Volume 12, Number 1.

- Reference Leukocyte Differential Count (Proportional) and Evaluation of Instrumental Methods. Approved Standard March 1992, section 3.1.2).
10. **Campuzano-Maya G.** Del hemograma manual al hemograma de cuarta generación. *Medicina & Laboratorio* 2007; 133: 511-550.
11. **Campuzano-Maya G.** Editorial: Los contadores de células: son excelentes pero no son perfectos. *Medicina & Laboratorio* 2005; 11: 309-310.
12. **Conn RB.** Clinical laboratories. Profit center, production industry or patient-care resource? *N Engl J Med* 1978; 298: 422-427.
13. **Campuzano-Maya G.** Papel del laboratorio clínico en la práctica médica. *Laboratorio Al Día* 1995; 5: 22-27.
14. **Forsman RW.** The value of the laboratory professional in the continuum of care. *Clin Leadersh Manag Rev* 2002; 16: 370-373.
15. **Plebani M.** Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 750-759.
16. **Sociedad Colombiana de Patología Clínica.** Manual de Codificación, Nomenclatura, Nivelación y Valores de Exámenes de laboratorio Clínico. Edimeco S.A., Medellín, Colombia. 2007, 1-100.
17. **College of American Pathologists.** Workload Recording Method & Personnel Management Manual. 1992.
18. **República de Colombia, Ministerio de Protección Social.** Resolución 1896 de 2001 por la cual se sustituye integralmente la Clasificación Única de Procedimientos en Salud.
19. **Sociedad Colombiana de Patología Clínica.** Manual de Codificación, Nomenclatura, Nivelación y Valores de Exámenes de laboratorio Clínico. Edimeco S.A., Medellín, Colombia. 2008, 1-100.
20. **Campuzano-Maya G.** El hemograma electrónico. *Laboratorio Al Día* 1995; 5: 28-41.
21. **Fajardo Lobo-Guerrero LF.** Procedimientos básicos en hematología. In *Técnicas de laboratorio en hematología clínica*, Restrepo-Mesa A. Sociedad Colombiana de Hematología, Editorial de la Universidad de Antioquia; Medellín, Colombia. 1975; 3-58.
22. **Bain BJ, Lewis SM, Bates I.** Basic haematological techniques. In *Dacie and Lewis practical haematology*, Lewis SM, Bain BJ and Bates I. 5th edition, Churchill Livingstone; Philadelphia, PA, USA. 2006; 26-57.
23. **Gagon TE, Athens JW, Boggs DR, Cartwright GE.** An evaluation of the variance of leukocyte counts as performed with the hemocytometer, Coulter, and Fisher instruments. *Tech Bull Regist Med Technol* 1966; 36: 274-281.
24. **Pohland D.** Evaluation of the automated haematology analyser Sysmex M-2000. *J Clin Chem Clin Biochem* 1989; 27: 41-47.
25. **Carlson DA, Ito RK, Statland BE, Daigneault R, DiPierro R, Horion L.** Evaluation of the Sysmex CC-800. An automated eight-parameter hematology instrument. *Am J Clin Pathol* 1986; 86: 55-60.
26. **Smeets EH, van Wersch JW.** Performance of a three-part dif impedance cytometer (Sysmex E-4000) in comparison with a cytochemical cytometer (Technicon H 6000). *J Clin Chem Clin Biochem* 1988; 26: 531-540.
27. **Burgi W, Marti HR.** Automated blood count analysis by trimodal size distribution of leukocytes with the SYSMEX E-5000. *J Clin Chem Clin Biochem* 1989; 27: 365-368.
28. **Hinchliffe RF, Laycock BJ, Clark SJ, Morton J, Anderson LM, Lilleyman JS.** An evaluation of the Sequoia-Turner Cell Dyn 900. *Clin Lab Haematol* 1985; 7: 157-165.
29. **Barnard DF, Carter AB, Crosland-Taylor PJ, Stewart JW.** An evaluation of the Coulter model S. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* 1969; 3: 26-33.
30. **Silver H.** Comparison and evaluation of the model S Coulter Counter and the Technicon SMA-4A. *Med Lab Technol* 1971; 28: 163-171.
31. **Lappin TR, Lamont A, Nelson MG.** An evaluation of the autoanalyzer SMA-4. *J Clin Pathol* 1969; 22: 11-18.
32. **Cave RJ, Holder RL, Morris TK, Taylor J, Smith D, Shinton NK.** An evaluation of the Technicon H6000 haematology system. *Clin Lab Haematol* 1983; 5: 203-214.
33. **Lappin TR, Lamont A, Nelson MG.** An evaluation of the Celloscope 401 electronic blood cell counter. *J Clin Pathol* 1972; 25: 539-542.
34. **Borud O, Stromme JH.** Evaluation of Celloscope 421 for the simultaneous measurement of red blood cells, haematocrit and mean cell volume. *Scand J Haematol* 1974; 13: 246-251.
35. **Bessman JD, Gilmer PR, Jr., Gardner FH.** Improved classification of anemias by MCV and RDW. *Am J Clin Pathol* 1983; 80: 322-326.
36. **Cornbleet J, Kessinger S.** Evaluation of Coulter S-Plus three-part differential in population with a high prevalence of abnormalities. *Am J Clin Pathol* 1985; 84: 620-626.
37. **Ross DW, Watson JS, Davis PH, Tracy SL.** Evaluation of the Coulter three-part differential screen. *Am J Clin Pathol* 1985; 84: 481-484.
38. **Sachse C, Henkel E.** An evaluation of the CELL-DYN 1700 haematology analyser: automated cell counting and three-part leucocyte differentiation. *Clin Lab Haematol* 1996; 18: 171-180.
39. **Whisler S, Dahlgren C.** Performance evaluation of the Sysmex pocH-100i automated hematology analyzer. *Lab Hematol* 2005; 11: 107-117.
40. **Briggs C, Kunka S, Pennaneach C, Forbes L, Machin SJ.** Performance evaluation of a new compact hematology analyzer, the Sysmex pocH-100i. *Lab Hematol* 2003; 9: 225-233.
41. **Payne BA, Pierre RV, Lee WK.** Evaluation of the Toa E-5000 Automated Hematology Analyzer. *Am J Clin Pathol* 1987; 88: 51-57.
42. **Bain BJ, Neill PJ, Scott D, Scott TJ, Innis MD.** Automated differential leucocyte counters: an evaluation of the Hemalog D and A comparison with the Hematrak. I. Principles of operation; reproducibility and accuracy on normal blood samples. *Pathology* 1980; 12: 83-100.
43. **Cox CJ, Habermann TM, Payne BA, Klee GG, Pierre RV.** Evaluation of the Coulter Counter model S-Plus IV. *Am J Clin Pathol* 1985; 84: 297-306.
44. **van Wersch JW, Bank C.** A new development in haematological cell counting: the Sysmex NE-8000, automaton for cell count and physical five-part leukocyte differentiation. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990; 28: 233-240.
45. **Buttarelli M, Gadotti M, Lorenz C, Toffalori E, Ceschini N, Valentini A, et al.** Evaluation of four automated hematology analyzers. A comparative study of differential counts (imprecision and inaccuracy). *Am J Clin Pathol* 1992; 97: 345-352.

46. **Cornbleet PJ, Myrick D, Levy R.** Evaluation of the Coulter STKS five-part differential. *Am J Clin Pathol* 1993; 99: 72-81.
47. **Davis BH, Bigelow NC.** Performance evaluation of a hematology blood counter with five-part leukocyte differential capability. *Am Clin Lab* 1999; 18: 8-9.
48. **Pierre RV.** Peripheral blood film review. The demise of the eyecount leukocyte differential. *Clin Lab Med* 2002; 22: 279-297.
49. **Laharrague PF, Fillola G, Corberand JX.** Evaluation of a new haematology analyser for whole blood count and full differential (NE-8000). *Nouv Rev Fr Hematol* 1992; 34: 303-307.
50. **Buttarelli M, Bulian P, Temporin V, Rizzotti P.** Sysmex SE-9000 hematology analyzer: performance evaluation on leukocyte differential counts using an NCCLS H20-A protocol. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Am J Clin Pathol* 1997; 108: 674-686.
51. **Peng L, Gao X, Jiang H, Peng Z, Su J.** Laboratory evaluation of the Sysmex SE-9500 automated haematology analyzer. *Clin Lab Haematol* 2001; 23: 237-242.
52. **Billett HH, Simson E, Main P, Bailey C, Guerra P.** The MAXM hematology autoanalyzer. An alternative? *Am J Clin Pathol* 1994; 102: 36-44.
53. **Fialon P, Becker M, Boisseau MR.** Evaluation of the white blood cell differential given by the new analyser Coulter STKS in both hematological and non-hematological patient groups. *Pathol Biol (Paris)* 1990; 38: 743-748.
54. **Flanagan P, Lane AM, Delamare A, Briggs CJ, McCarthy DA.** An evaluation of the Cell-Dyn 1000. *Clin Lab Haematol* 1987; 9: 313-320.
55. **Fournier M, Gireau A, Chretien MC, Ghevaert C, Boniface B, Goudemand J, et al.** Laboratory evaluation of the Abbott Cell DYN 3500 5-part differential. *Am J Clin Pathol* 1996; 105: 286-292.
56. **Van den Bossche J, Devreese K, Malfait R, Van de Vyvere M, Wauters A, Neeis H, et al.** Reference intervals for a complete blood count determined on different automated haematology analysers: Abx Pentra 120 Retic, Coulter Gen-S, Sysmex SE 9500, Abbott Cell Dyn 4000 and Bayer Advia 120. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 69-73.
57. **Bourner G, Dhaliwal J, Sumner J.** Performance evaluation of the latest fully automated hematology analyzers in a large, commercial laboratory setting: a 4-way, side-by-side study. *Lab Hematol* 2005; 11: 285-297.
58. **Harris N, Jou JM, Devoto G, Lotz J, Pappas J, Wranovics D, et al.** Performance evaluation of the ADVIA 2120 hematology analyzer: an international multicenter clinical trial. *Lab Hematol* 2005; 11: 62-70.
59. **Lacombe F, Lacoste L, Vial JP, Briaes A, Reiffers J, Boisseau MR, et al.** Automated reticulocyte counting and immature reticulocyte fraction measurement. Comparison of ABX PENTRA 120 Retic, Sysmex R-2000, flow cytometry, and manual counts. *Am J Clin Pathol* 1999; 112: 677-686.
60. **Buttarelli M, Temporin V, Ceravolo R, Farina G, Bulian P.** The new reticulocyte parameter (RET-Y) of the Sysmex XE 2100: its use in the diagnosis and monitoring of post-treatment sideropenic anemia. *Am J Clin Pathol* 2004; 121: 489-495.
61. **Canals C, Remacha AF, Sarda MP, Piazuelo JM, Royo MT, Romero MA.** Clinical utility of the new Sysmex XE 2100 parameter - reticulocyte hemoglobin equivalent - in the diagnosis of anemia. *Haematologica* 2005; 90: 1133-1134.
62. **Field D, Taube E, Heumann S.** Performance evaluation of the immature granulocyte parameter on the Sysmex XE-2100 automated hematology analyzer. *Lab Hematol* 2006; 12: 11-14.
63. **Endoh A, Yagihashi A, Asanuma K, Moriai R, Izawa A, Koyanagi Y, et al.** Hematopoietic progenitor cell counts performed by the Sysmex SE-9000 analyzer can guide timing of peripheral blood stem cell harvest. *Anticancer Res* 2001; 21: 601-604.
64. **Ansari-Lari MA, Kickler TS, Borowitz MJ.** Immature granulocyte measurement using the Sysmex XE-2100. Relationship to infection and sepsis. *Am J Clin Pathol* 2003; 120: 795-799.
65. **Letestu R, Marzac C, Audat F, Belhocine R, Tondeur S, Baccini V, et al.** Use of hematopoietic progenitor cell count on the Sysmex XE-2100 for peripheral blood stem cell harvest monitoring. *Leuk Lymphoma* 2007; 48: 89-96.
66. **Gulati G, Behling E, Kocher W, Schwarting R.** An evaluation of the performance of Sysmex XE-2100 in enumerating nucleated red cells in peripheral blood. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 1077-1083.
67. **Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S, Machin SJ.** Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2004; 126: 93-99.
68. **McCabe DJ, Harrison P, Sidhu PS, Brown MM, Machin SJ.** Circulating reticulated platelets in the early and late phases after ischaemic stroke and transient ischaemic attack. *Br J Haematol* 2004; 126: 861-869.
69. **Kickler TS, Oguni S, Borowitz MJ.** A clinical evaluation of high fluorescent platelet fraction percentage in thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol* 2006; 125: 282-287.
70. **Abe Y, Wada H, Tomatsu H, Sakaguchi A, Nishioka J, Yabu Y, et al.** A simple technique to determine thrombopoiesis level using immature platelet fraction (IPF). *Thromb Res* 2006; 118: 463-469.
71. **Wever PC, Henskens YM, Kager PA, Dankert J, van Gool T.** Detection of imported malaria with the Cell-Dyn 4000 hematology analyzer. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4729-4731.
72. **Huh J, Jung J, Yoon H, Chung W.** Pseudoeosinophilia associated with malaria infection determined in the Sysmex XE-2100 hematology analyzer. *Ann Hematol* 2005; 84: 400-402.
73. **van der Meer W, Dinnissen J, Keijzer MH.** Evaluation of the Sysmex XT-2000i, a new automated haematology analyser. *Sysmex J Intern* 2002; 12: 71-75.
74. **Ruzicka K, Veitl M, Thalhammer-Scherrer R, Schwarzenberger I.** The new hematology analyzer Sysmex XE-2100: performance evaluation of a novel white blood cell differential technology. *Arch Pathol Lab Med* 2001; 125: 391-396.
75. **Kim YR, Yee M, Metha S, Chupp V, Kendall R, Scott CS.** Simultaneous differentiation and quantitation of erythroblasts and white blood cells on a high throughput clinical haematology analyser. *Clin Lab Haematol* 1998; 20: 21-29.
76. **Johannessen B, Roemer B, Flatmoen L, Just T, Aarsand AK, Scott CS.** Implementation of monoclonal antibody fluorescence on the Abbott CELL-DYN Sapphire haematology analyser: evaluation of lymphoid, myeloid and platelet markers. *Clin Lab Haematol* 2006; 28: 84-96.

77. **Peterson P, Blomberg DJ, Rabinovitch A, Cornbleet PJ, Hematology and Clinical Microscopy Resource Committee of the College of American Pathologists.** Physician review of the peripheral blood smear: when and why. *An opinion. Lab Hematol* 2001; 7: 157-179.
78. **International Council for Standardization in Haematology (ISH): Expert Panel on Cytometry.** Recommendations of the International Council for Standardization in Haematology for ethylenediaminetetraacetic acid anticoagulation of blood for blood cell counting and sizing. *Am J Clin Pathol* 1993; 100: 371-372.
79. **Houwen B.** Blood film preparation and staining procedures. *Lab Hematol* 2000; 6: 1-7.
80. **Hayashi M, Gauthier S, Tatsumi N.** Evaluation of an automated slide preparation and staining unit. *Sysmex J Intern* 1996; 6: 63-69.
81. **Sandhaus L, Dillman C, Clement R, Losh D.** Errors in the hematology laboratory: why do they occur and what can we do to reduce them? *Lab Hematol* 2004; 10: 197-199.
82. **Dalal BI, Brigden ML.** Artifacts that may be present on a blood film. *Clin Lab Med* 2002; 22: 81-100, vi.
83. **Rogers CH.** Blood sample preparation for automated differential systems. *Am J Med Technol* 1973; 39: 435-442.
84. **Bacus JW.** Erythrocyte morphology and centrifugal "spinner" blood film preparations. *J Histochem Cytochem* 1974; 22: 506-516.
85. **Megla GK.** Automatic blood film preparation by rheologically controlled spinning. *Am J Med Technol* 1976; 42: 336-342.
86. **May JA, Sage BH.** Spinner films for reticulocyte counts. *Am J Med Technol* 1976; 42: 357-360.
87. **Wolley RC, Dembitzer HM, Herz F, Schreiber K, Koss LG.** The use of a slide spinner in the analysis of cell dispersion. *J Histochem Cytochem* 1976; 24: 11-15.
88. **ICSH reference method for staining of blood and bone marrow films by azure B and eosin Y (Romanowsky stain).** International Committee for Standardization in Haematology. *Br J Haematol* 1984; 57: 707-710.
89. **Woronzoff-Dashkoff KP.** The Ehrlich-Chenzinsky-Plehn-Malachowski-Romanowsky-Nocht-Jenner-May-Grünwald-Leishman-Reuter-Wright-Giemsa-Lillie-Roe-Wilcox stain. The mystery unfolds. *Clin Lab Med* 1993; 13: 759-771.
90. **Marshall PN.** Romanowsky-type stains in haematology. *Histochem J* 1978; 10: 1-29.
91. **Woronzoff-Dashkoff KK.** The Wright-Giemsa stain. Secrets revealed. *Clin Lab Med* 2002; 22: 15-23.
92. **Bain BJ.** Diagnosis from the blood smear. *N Engl J Med* 2005; 353: 498-507.



Islas Galápagos, Ecuador. 2008
Carlos A. Lozano M.