

# SEED Hematología Veterinaria



## Uso diagnóstico de los índices de maduración reticulocitaria del analizador XN-V de Sysmex

### Alejandro Pérez-Écija

DVM, MSc, PhD, Diplomado ECVP

### Francisco Javier Mendoza García

DVM, MSc, PhD, Diplomado ECEIM

*Dpto. Medicina y cirugía animal, Facultad de veterinaria,  
Universidad de Córdoba, España*

### Las anemias caninas: diferencial e importancia de un diagnóstico certero

Las anemias (entendidas como la disminución en el hematocrito (HCT), recuento de eritrocitos y/o concentración de hemoglobina) son uno de los procesos más comunes en clínica veterinaria de pequeños animales [1]. En el caso de los caninos, las anemias se pueden clasificar atendiendo a múltiples variables (véase Tabla 1).

No obstante, la clasificación de las anemias según su causa es la más útil para el clínico, pues permite establecer un tratamiento y pronóstico mucho más personalizado para el paciente (véase Tabla 2).

Ante el elevado número de procesos que pueden provocar anemia en caninos, sería esencial para el clínico poder enfocar el diagnóstico según la etiología de una forma temprana y precisa, permitiendo así orientar las pruebas complementarias y reducir el tiempo necesario para establecer un tratamiento adecuado.

**Tabla 1** Diferentes clasificaciones de la anemia en caninos atendiendo a varios criterios

<b>Clasificación según gravedad</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Anemias leves → HCT 30-37%</li> <li>■ Anemias moderadas → HCT 20-29%</li> <li>■ Anemias graves → HCT 13-19%</li> <li>■ Anemias severas → HCT &lt; 13%</li> </ul>
<b>Clasificación según morfología del eritrocito</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Anemias hipocrómicas o normocrómicas</li> <li>■ Anemias microcíticas, normocíticas o macrocíticas</li> </ul>
<b>Clasificación según respuesta medular</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Anemias regenerativas (hemolíticas y hemorrágicas agudas)</li> <li>■ Anemias no regenerativas (hemorrágicas crónicas y sobreagudas, fallo o supresión medular)</li> </ul>

**Tabla 2** Clasificación de las anemias en caninos atendiendo a su causa o etiología, con ejemplo de las principales patologías en cada subtipo

<b>Anemias hemorrágicas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Traumatismos</li> <li>■ Parasitosis gastroentéricas o externas</li> <li>■ Trombocitopenias, trombocitopatías</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Neoplasias, úlceras o perforaciones digestivas</li> <li>■ Intoxicaciones por warfarínicos</li> <li>■ Otras coagulopatías</li> </ul>
<b>Anemias hemolíticas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Anemia inmuno hemolítica idiopática</li> <li>■ Intoxicaciones</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Eritroparásitos</li> <li>■ Déficits metabólicos eritrocitarios congénitos</li> </ul>
<b>Anemias por fallo o supresión de la eritropoyesis</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Daño medular (infección, neoplasia, tóxicos)</li> <li>■ Anemia de enfermedad crónica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Nefropatías</li> <li>■ Ferropenias</li> </ul>

## La importancia de los reticulocitos en pacientes caninos y pruebas para su determinación

La eritropoyesis es el proceso fisiológico que permite el reciclaje y regeneración de los eritrocitos circulantes en el organismo [2]. El último componente celular eritroide previo a los glóbulos rojos maduros circulantes es el denominado reticulocito. Los reticulocitos se producen de forma constante a nivel medular y, tras un periodo breve de almacenaje en la misma, se liberan (en bajas concentraciones) a circulación sistémica, donde finalizan sus últimos pasos de maduración (perdiendo los restos de ARN, mitocondrias y otras organelas).

La principal indicación de la medición de reticulocitos circulantes es poder diferenciar entre cuadros de anemia regenerativa y arregenerativa [2]. Un incremento absoluto en el número de reticulocitos circulantes suele determinar la presencia de una anemia regenerativa. No obstante, únicamente evaluando el número de reticulocitos no podremos diferenciar entre anemias hemorrágicas agudas y hemolíticas. De igual forma, en los procesos no regenerativos, si únicamente determinamos el número de reticulocitos no podremos distinguir entre cuadros con eritropoyesis inadecuada por daño medular y aquellos donde el proceso se origina extramedularmente (por ejemplo, las anemias de enfermedad crónica).

## Pruebas para medición reticulocitos

La prueba más idónea para determinar reticulocitos en caninos es el conteo de los mismos tras tinción diferencial [3], ya sea de forma manual (utilizando tinciones como el nuevo azul de metileno o el azul cresil brillante) o usando analizadores automáticos (que marcan los reticulocitos con fluorocromos específicos para detectar los restos de ADN y ARN). Al comparar ambas técnicas, el método manual reporta mayores errores estadísticos y es mucho más dependiente de la destreza del operador, siendo necesario, como poco, contabilizar 1.000 reticulocitos para obtener una aproximación fiable al dato real. El uso de analizadores automáticos, como el XN-V, permite determinar de forma rápida (menos de un minuto) la fluorescencia presente en más de 30.000 eritrocitos, obteniendo datos mucho más reproducibles y exactos que en los conteos manuales [4].

Si bien tradicionalmente el dato que los clínicos utilizaban para el estudio de la respuesta regenerativa era el % de reticulocitos, se ha de tener en consideración que este parámetro presenta graves déficits a la hora de evaluar el poder de respuesta medular [2, 3]. Por ejemplo, mientras que en un perro sano un 4 % de reticulocitos se considera un valor elevado, ese mismo porcentaje en un perro anémico con 2 millones de eritrocitos representa solo 80.000 reticulocitos/ $\mu$ L (valor en rango para animales sanos pero extremadamente insuficiente para pacientes con este grado de anemia). Ante esta situación, siempre es mucho más eficaz evaluar el grado de regeneración estudiando el conteo absoluto de reticulocitos o bien alguno de los múltiples índices de evaluación de regeneración publicados para caninos (véase Tabla 3).

*El objetivo de la investigación preliminar presentada en este documento fue determinar la validez de parámetros hematológicos adicionales al recuento de reticulocitos en pacientes caninos anémicos para así poder distinguir entre cuadros hemorrágicos y hemolíticos y entre los distintos procesos que pueden cursar con anemia no regenerativa.*

**Tabla 3** Principales métodos para el estudio de la regeneración medular en caninos

	Ventajas	Inconvenientes	Referencia en caninos										
<p><b>Porcentaje de reticulocitos</b></p> $\text{RET\%} = \frac{\text{RET [10}^6/\mu\text{l]}}{\text{RBC [10}^6/\mu\text{l]}} \times 100$	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Dato aportado por analizadores automáticos básicos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✗ Al no considerar el nivel de anemia, NO es útil para evaluar a pacientes anémicos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Hasta 1 % en pacientes normales.</li> <li>■ En anémicos depende del grado de anemia.</li> </ul>										
<p><b>Contaje absoluto de reticulocitos</b></p> $\text{RET\#} = \frac{\text{RET [\%]} \times \text{RBC [10}^6/\mu\text{l]}}{100}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Más útil que el % para evaluar la capacidad de respuesta medular.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✗ Solapamiento entre animales sanos y anemias arregenerativas.</li> <li>✗ No diferencia entre regeneración por hemólisis o hemorragia.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ En sanos entre 20.000 y 150.000 por microlitro.</li> <li>■ En cuadros regenerativos usualmente valor superior.</li> </ul>										
<p><b>Índice de producción de reticulocitos</b></p> $\text{IPR} = \frac{\text{RET [\%]}}{\text{Días maduración reticulocito}} \times \frac{\text{HCT [\%]}}{0,45}$ <p>En esta fórmula el valor "Días maduración reticulocito" se obtiene según el HCT del paciente:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>HCT del paciente</th> <th>Días maduración reticulocito</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>36 – 45 %</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>26 – 35 %</td> <td>1,5</td> </tr> <tr> <td>16 – 25 %</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>≤ 15 %</td> <td>2,5</td> </tr> </tbody> </table>	HCT del paciente	Días maduración reticulocito	36 – 45 %	1	26 – 35 %	1,5	16 – 25 %	2	≤ 15 %	2,5	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Información más útil en anémicos, al considerar el hematocrito del paciente.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✗ Índice originario de medicina humana, sin estar plenamente estandarizado en veterinaria. Difícil personalizar según los datos del paciente.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Cualquier valor por encima de 1 se considera signo de regeneración.</li> </ul>
HCT del paciente	Días maduración reticulocito												
36 – 45 %	1												
26 – 35 %	1,5												
16 – 25 %	2												
≤ 15 %	2,5												

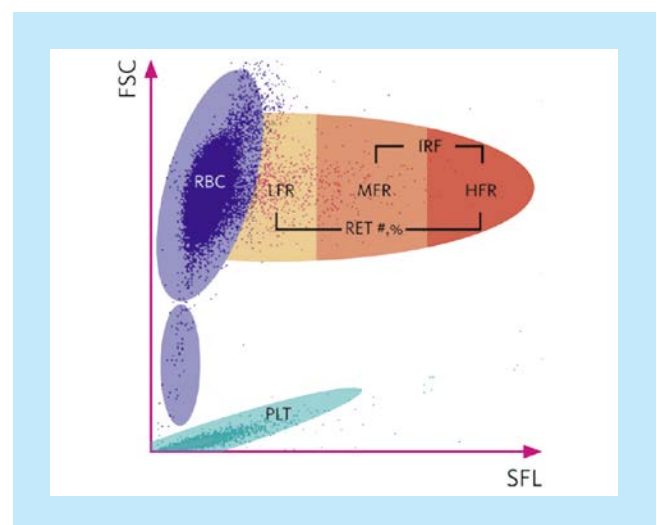
## La maduración reticulocitaria: significado e importancia

Además de realizar un conteo absoluto del número de reticulocitos, el analizador XN-V de Sysmex puede utilizar su tecnología de citometría de flujo y marcadores con fluorocromos específicos para determinar el grado de maduración de los reticulocitos circulantes [5], clasificándolos en función de su contenido en ARN en las siguientes categorías:

- LFR (Low-fluorescence reticulocytes) o reticulocitos maduros.
- MFR (Medium-fluorescence reticulocytes) o reticulocitos de maduración intermedia.
- HFR (High-fluorescence reticulocytes) o reticulocitos inmaduros, con alto contenido en ARN.

Además, el analizador XN-V proporciona el valor IRF (Immature Reticulocyte Fraction), obtenido como sumatorio de las fracciones MFR y HFR. La distribución de estos reticulocitos también se puede estudiar en el correspondiente escatergrama del canal de reticulocitos (véase Figura 1).

Estos parámetros ya son utilizados en medicina humana para obtener una primera sospecha diagnóstica y clasificar los cuadros anémicos según su etiología, entre otras aplicaciones [6].



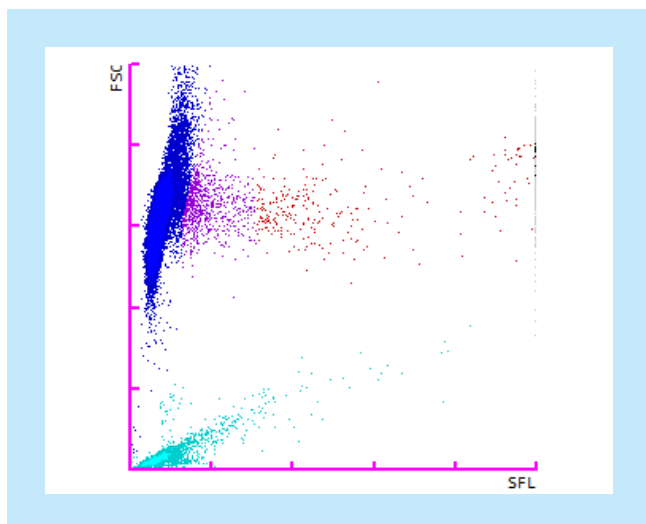
**Fig. 1** Representación de las distintas fracciones de maduración reticulocitaria en el escatergrama del canal de reticulocitos del analizador hematológico XN-V de Sysmex

## Rangos de referencia caninos para maduración reticulocitaria

Para estudiar la utilidad de los parámetros de maduración reticulocitaria obtenidos con el equipo XN-V de Sysmex, primero se han de establecer los rangos de referencia de estos valores en caninos sanos. Si bien existen estudios previos [5], los mismos únicamente utilizaron un número limitado de pacientes y se centraron en perros de raza Beagle. El equipo de investigación de la Universidad de Córdoba está analizando estos parámetros entre los animales remitidos al Hospital Clínico Veterinario Francisco Santisteban (trabajo en desarrollo). Tras la evaluación inicial de 489 caninos no anémicos (n = 489), los rangos de referencia para estos parámetros se pueden consultar en la Tabla 4, recogándose en la Figura 2 el escatergrama “medio” que un perro no anémico suele presentar.

**Tabla 4** Valores medios y rango de referencia (intervalo de confianza del 95%) de los parámetros de maduración reticulocitaria en caninos no anémicos (n = 489)

	LFR	IRF	MFR	HFR
Media (%)	75,4	24,6	9,8	14,5
Rango de referencia (%)	60-88	11-39	4-16	5-26

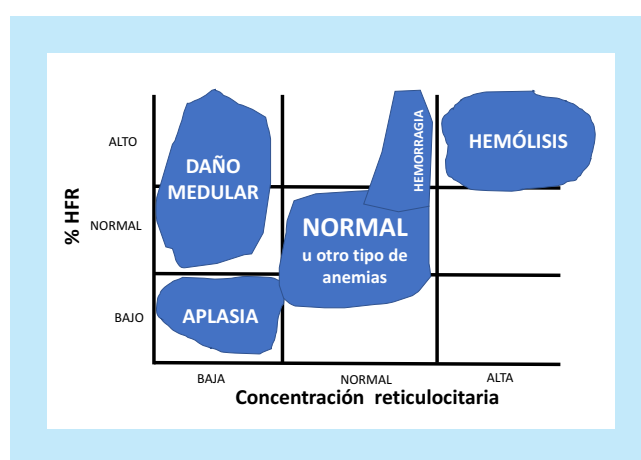


**Fig. 2** Escatergrama del canal de reticulocitos en un paciente canino no anémico prototipo

En esta población de estudio se han evaluado animales de ambos sexos, con un rango de edad entre 7 días y 15 años y de 45 razas diferentes. Tras un estudio estadístico preliminar, no se han detectado efectos significativos en estos valores dependientes del sexo, edad o raza del paciente, si bien se siguen recopilando datos y realizando determinaciones.

## Interpretación diagnóstica de la maduración reticulocitaria en caninos anémicos: el diagrama Écija-Mendoza

Con el objetivo de evaluar la capacidad de los parámetros de maduración reticulocitaria a la hora de distinguir entre los distintos tipos de anemia en caninos, el equipo de investigación de la Universidad de Córdoba ha estudiado estos parámetros en un total de 153 caninos anémicos (n = 153) con diagnóstico etiológico confirmado. Tras el análisis estadístico de los datos, hemos realizado el diagrama diagnóstico específico para anemia canina Écija-Mendoza (véase figura 3).



**Fig. 3** Regeneración y flags en caninos patológicos

En el diagrama Écija-Mendoza se considera al mismo tiempo el valor de HFR (elevado por encima del 26%, bajo si es inferior al 5%) y la concentración reticulocitaria (elevada por encima de 150.000 y disminuida bajo 20.000 reticulocitos por microlitro). En este diagrama se obtienen varias cuadrículas diagnósticas que permiten sospechar y diferenciar entre la presencia de hemólisis, hemorragia y daño medular. En la Tabla 5 se recogen los datos de sensibilidad, especificidad y valores predictivos para el diagnóstico de cada una de las citadas causas de anemia utilizando los puntos de corte preliminares establecidos por el grupo de investigación de la Universidad de Córdoba.

Se ha de destacar que los datos presentados en este material son preliminares y el grupo de investigación de la Universidad de Córdoba continúa recopilando determinaciones y realizando análisis estadísticos para mejorar esta herramienta diagnóstica. Igualmente, este diagrama no viene a sustituir a otras pruebas de diagnóstico etiológico definitivo, siendo el objetivo del mismo ayudar a la diferenciación fácil y temprana entre procesos hemorrágicos, hemolíticos y de daño medular.

**Tabla 5** Diagrama Écija-Mendoza donde se recoge la clasificación de distintos cuadros etiológicos anémicos atendiendo al porcentaje de HFR y concentración reticulocitaria

Cuadro etiológico y número de casos	HFR	Número reticulocitos	Especificidad diagnóstica*	Sensibilidad Diagnóstica**	Patologías presentes
Hemólisis (n=50)	ALTO (≥ 26%)	ALTO (≥ 150.000/μL)	92%	76%	Anemia inmunohemolítica (idiopáticas y secundarias), babesiosis, etc.
Hemorragia aguda (n=25)	Normal-alto (≥ 21%)	Normal-alto (100.000 – 150.000/μL)	97%	72%	Traumatismos, intoxicación por cumarínicos, otras coagulopatías.
Aplasia medular (n=15)	BAJO (≤ 5%)	BAJO (≤ 20.000/μL)	99%	87%	Daño vírico (parvovirus, etc.), tóxico (quimioterapia, etc.).
Daño medular de otro tipo (n=15)	BAJO (≤ 5%)	(> 20.000/μL)	99%	80%	Leucemias (mieloides, linfoides), nefropatías terminales, etc.

\* La especificidad diagnóstica denota la capacidad del algoritmo para descartar el agente etiológico si el paciente presenta valores de HFR y reticulocitos diferentes [7]. Por ejemplo, el 92% de los pacientes no clasificados como hemolíticos realmente no tendrán hemólisis.

\*\* La sensibilidad diagnóstica representa la capacidad del algoritmo para reconocer la etiología tras la anemia atendiendo a los valores de HFR y reticulocitos circulantes [7]. Por ejemplo, el 76% de los pacientes que cumplan los criterios de la clasificación “hemólisis” realmente sufren hemólisis.

## Conclusiones

La diferenciación temprana de la causa subyacente en cuadros de anemia canina es uno de los mayores retos diagnósticos que afrontan los veterinarios clínicos en la actualidad. Un conteo preciso y fiable del número total de reticulocitos, junto con el estudio de las distintas formas de maduración circulante de los mismos puede permitir una evaluación mucho más rigurosa y detallada de cada paciente en el laboratorio veterinario. En este estudio preliminar se han establecido valores de referencia para las distintas fracciones de maduración reticulocitaria (LFR, MFR, HFR, IFR) determinadas por el analizador XN-V de Sysmex. Tras el análisis de más de 150 casos reales de anemia se ha diseñado el diagrama Écija-Mendoza, una herramienta de ayuda diagnóstica que permite diferenciar entre procesos de hemólisis, hemorragia aguda y anemia por daño medular. Si bien este algoritmo no viene a sustituir a las pruebas definitivas para confirmación del diagnóstico etiológico, la especificidad y sensibilidad diagnóstica de las categorías propuestas permite de forma rápida al clínico sospechar sobre la patología subyacente.

## Referencias

- [1] **Thrall MA et al. (2012):** *Veterinary hematology and clinical chemistry*. 2nd ed. Wiley-Blackwell. Section II. Chapter 6.
- [2] **Latimer KS (2011):** *Duncan and Prasse's veterinary laboratory medicine clinical pathology*. 5th ed. Wiley-Blackwell. Chapter 1.
- [3] **Cowgirl ES et al. (2003):** *Clinical application of reticulocyte counts in dogs and cats*. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 33(6):1223-1244.
- [4] **Sysmex Europe GmbH (2016):** *SEED hematology: the importance of reticulocyte detection*. Online educational material.
- [5] **Mathers A et al. (2012):** *Reticulocyte measurements in rat, dog and mouse whole blood samples using the Sysmex XT-2000iV*. *Comp Clin Pathol* 21:631–637.
- [6] **D'Onofrio G et al. (1996):** *Indicators of haematopoietic recovery after bone marrow transplantation: the role of reticulocyte measurements*. *Clin Lab Haem* 18(Suppl.1):45 – 53.
- [7] **Paltrinieri S et al. (2012):** *Sensitivity and specificity of manual and automated measurements of reticulocyte parameters for classification of anemia in dogs: 174 cases (1993-2013)*. *J Am Vet Med Assoc* 249(7):776-786.