

HEMATOLOGÍA: PISTAS EN LA SANGRE

Cristina Bonvehí¹, Antonio Meléndez-Lazo²

¹Centro Veterinario Los Sauces

C/Santa Engracia, 63. Madrid (España)

²Laboratorio Veterinario LABOKLIN

C/Sauceda 8, Madrid (España)

GENERALIDADES

La hematología es una parte fundamental del diagnóstico laboratorial. La correcta interpretación de los resultados requiere tener en cuenta el anticoagulante y el método utilizados, así como las particularidades de las distintas especies.

El EDTA es el anticoagulante de elección para los estudios de hematología en mamíferos, habiéndose descrito diferencias entre el uso de K₂-EDTA y K₃-EDTA en función del método utilizado, el tiempo de procesamiento de la muestra, el estado ácido-base del paciente, etc. El retraso en el procesamiento de la sangre puede producir alteraciones morfológicas y ruptura celular, artefactos en la tinción, crecimiento bacteriano, ... Un estudio describió cambios significativos en muestras en EDTA procesadas tras refrigeración a 4°C respecto a procesamiento en menos de 1h con el analizador ADVIA 120: aumento de MCV (72 h) y MPV (48 h) y disminución del recuento de monocitos (24 h) en conejos; aumento de MCV y disminución de MCHC, CHCM y recuento de monocitos (24 h) en ratas; aumento de MCV, RCDW y MPV y disminución de MCHC, CHCM y recuento de monocitos (24 h) en ratones.¹

En la mayoría de aves se recomienda el uso de EDTA, sin embargo puede causar hemólisis, insuficiente anticoagulación y artefactos en córvidos, avestruces, algunas anátides, grúidos y alcedínidos.² En el caso de los reptiles el EDTA se ha asociado a hemólisis especialmente en tortugas, siendo este efecto menor en lagartos y serpientes.³ En *Iguana iguana* se han descrito diferencias significativas entre heparina y K₂-EDTA en el recuento absoluto de glóbulos blancos, heterófilos, monocitos y trombocitos, pero no en el PCV o las proteínas plasmáticas; el recuento total y diferencial de leucocitos sobre el frotis sin anticoagulante fue más cercano a los resultados obtenidos con muestras en EDTA que en heparina.⁴ Un estudio comparando muestras sanguíneas procesadas inmediatamente post extracción y post conservación a 4°C mostró hemólisis en *Ara* sp tras 12 horas en citrato potásico y 24 horas en K₃-EDTA y heparina de litio; en *Python molurus* se observó hemólisis en citrato potásico a las 12 horas pero no se hallaron diferencias significativas entre las muestras analizadas inmediatamente y tras 24 horas de almacenamiento en K₃-EDTA y heparina.⁵

Idealmente el frotis sanguíneo debe realizarse con una muestra recién extraída y sin anticoagulante en todas las especies.

La centrifugación de sangre en tubos de hematocrito genera la distribución de los componentes sanguíneos según la densidad celular, con las células más pesadas debajo. Los eritrocitos se disponen en la capa inferior formando el “packed cell volume” (con los reticulocitos en la fracción superior), mientras que los leucocitos y las plaquetas permanecen en el “buffy coat” o “costra flogística” (granulocitos adyacentes a los eritrocitos, linfocitos y monocitos en el área intermedia y plaquetas en la zona superior adyacentes a la fracción líquida). En mamíferos se considera que la mezcla de células entre capas es mínima, y en términos generales se estima que cada aumento del 1% del “buffy coat” se corresponde a aproximadamente 20,000 leucocitos/ μ l.

Un estudio con microscopía óptica y electrónica convirtiendo el “buffy coat” en “cell tube blocks” en rapaces (n=9) y varias especies de reptiles (n=7) mostró una distribución de las células por capas en el “buffy coat” más irregular que en mamíferos, especialmente en los reptiles. Esto hace menos preciso el uso del % de “buffy coat” para el recuento de glóbulos blancos. En las rapaces se observaron 3 capas: eritrocitos, granulocitos (heterófilos, eosinófilos y basófilos) y mononucleares (monocitos, linfocitos y trombocitos, con marcada mezcla de linfocitos y trombocitos). En *Accipiter gentilis* y *Falco peregrinus* se detectó una capa

XVIII Congreso de Especialidades Veterinarias

26-27 de Abril de 2019 - Palacio de Congresos - ZARAGOZA



de eritrocitos pequeños y de núcleo grande entre las capas de granulocitos y mononucleares, interpretados como eritrocitos inmaduros. Se identificaron posibles linfocitos T (inmunotinción CD3) sobre la capa de trombocitos (*A. gentilis*) o dispersos entre la capa mononuclear (*F. peregrinus*). En los reptiles la separación por capas fue menos evidente, con heterófilos en las fracciones de eritrocitos y mononucleares, y eritrocitos en el "buffy coat". En *Iguana iguana* y *Tupinambis merianae* se observaron 2 capas: granulocitos y mononucleares, con heterófilos a lo largo de ambas; en el resto se observó una capa única. En *Testudo horsfieldi* se observó mezcla de eritrocitos con heterófilos, linfocitos y trombocitos -este dato concuerda con la presencia de eritrocitos, trombocitos y granulocitos en un estudio de separación por densidad celular con Percoll en *Caretta caretta*.^{6,7}

Los contadores hematológicos automáticos se basan en 3 métodos: análisis cuantitativo del "buffy coat", tecnología de impedancia y citometría de flujo, a menudo combinados. La aplicabilidad en las especies de mamíferos que acuden a la clínica de exóticos (hurones, cobayas, conejos, ratas, ratones, monos, cerdos, cabras, ...) depende del analizador utilizado, pero es cada vez mayor.⁸ Alternativamente pueden realizarse recuentos manuales con hemocitómetros. Las aves y los reptiles poseen eritrocitos y trombocitos nucleados, hecho que limita el uso de los analizadores de hematología automáticos utilizados en mamíferos. A pesar de que las técnicas de citometría de flujo pueden proporcionar información valiosa, sigue siendo recomendable realizar el recuento manual en hemocitómetro con sistemas de dilución/tinción (Unopette, Natt & Herrick, etc) y evaluar el frotis sanguíneo.^{3,9-11} En los últimos años se están desarrollando técnicas de citometría de imagen en frotis sanguíneos con programas de reconocimiento de imágenes, con alto potencial en la hematología de aves y reptiles.^{12,13}

Una de las principales ventajas del uso de contadores automáticos es la reducción del tiempo de trabajo y la disminución del error humano. Sin embargo, todos los aparatos tienen limitaciones por lo que el examen del frotis sanguíneo sigue siendo imprescindible para validar la distribución de las poblaciones de leucocitos y detectar la presencia de eritrocitos nucleados, poiquilocitosis, desviación a la izquierda (neutrófilos en banda y precursores), cambios tóxicos en neutrófilos y otras alteraciones en la morfología leucocitaria, cuerpos de inclusión, hemoparásitos, mastocitos, agregados plaquetarios, etc. Debemos familiarizarnos con las características propias de cada especie, como la presencia de inclusiones intracitoplasmáticas denominadas "cuerpos de Kurloff" en los linfocitos de las cobayas.

El hemograma puede variar en función del estado de salud, pero también debido a múltiples factores como el aparato y método utilizados, la especie, el sexo o la edad del paciente, por lo que debemos tratar de utilizar fuentes bibliográficas de referencia con población y metodología lo más similar posible a nuestros casos. Esto es especialmente complejo en los reptiles, habiéndose descrito cambios marcados según las condiciones ambientales (estación, localización geográfica, estado de cautividad o libertad, ...), estado de hibernación, fase reproductiva, sitio de punción venosa, ... La estacionalidad causa en bastantes especies un aumento de heterófilos y linfocitos en verano y una disminución en invierno o fase de hibernación, mientras que los eosinófilos varían a la inversa y los monocitos y los basófilos se ven poco afectados. Estas variaciones y la escasa bibliografía disponible dificultan la interpretación de los resultados, por lo que la valoración de la morfología celular y la obtención de hemogramas seriados del paciente son especialmente importantes.³

ALTERACIONES

La anemia puede deberse a la pérdida, destrucción y/o disminución de la producción de glóbulos rojos. El abordaje diagnóstico laboratorial incluye la valoración de la capacidad de regeneración (recuento de reticulocitos) y los índices eritrocitarios. Los principales tipos de anemia en humanos, perros y gatos son macrocítica hipocrómica, normocítica normocrómica y microcítica hipocrómica, con distintos trastornos asociados a cada grupo. El tiempo necesario para el inicio de la respuesta regenerativa debe tenerse en cuenta (3-5 días), igual que la posibilidad de que existan varios mecanismos en el mismo paciente. La evaluación de la anemia puede ser especialmente difícil en reptiles, ya que sus eritrocitos tienen vidas medias de hasta 600-800 días.

Los hurones presentan una muy rápida disminución de los parámetros hematológicos al ser sometidos a anestesia, especialmente el PCV, la concentración de hemoglobina y el recuento de eritrocitos, aunque el recuento de leucocitos y las proteínas plasmáticas también se ven afectados. 45 minutos post anestesia

XVIII Congreso de Especialidades Veterinarias

26-27 de Abril de 2019 - Palacio de Congresos - ZARAGOZA



existe una recuperación parcial de los valores preanestésicos.¹⁴ Esta especie presenta con gran frecuencia supresión de la médula ósea por estro persistente en hembras y por hiperadrenocorticismo.

Un estudio en 233 conejos anémicos mostró 70% de animales con PCV 26-32%, 19% animales con PCV 19-25% y 11% animales con PCV <19%. El 80% de las anemias eran normocíticas y, de éstas, la mitad eran normocrómicas. Se clasificaron las etiologías como: 29% inflamatoria o neoplásica (principalmente enfermedad dental y *Encephalitozoon*), 24% hemorrágica (especialmente fracturas, enfermedad de tracto urinario bajo y afecciones uterinas incluyendo neoplasias), 7% enfermedad renal, 0.5% hemolítica (presuntamente por torsión de lóbulo hepático), 14% suma de varios mecanismos y 25% idiopática. Este estudio muestra varias limitaciones en cuanto al diagnóstico de los pacientes y la inclusión en los distintos grupos. El índice de reticulocitos de los conejos anémicos fue significativamente superior al de los no anémicos, mientras que no se observaron diferencias en el recuento total. Este estudio, igual que otros, muestra un índice de reticulocitos en conejos sanos mayor que el de otras especies (hasta 5-6%). Las alteraciones en los índices eritrocitarios fueron poco frecuentes y no se halló utilidad diagnóstica. Las proteínas totales (PT) fueron significativamente más bajas en las anemias hemorrágicas, pero dentro del rango de referencia, igual que se ha observado en gatos, hecho a tener en cuenta al utilizar las PT como herramienta diagnóstica en anemias hemolíticas.¹⁵

La poiquilocitosis es la presencia de eritrocitos de forma anómala en sangre periférica. Las alteraciones pueden deberse a cambios bioquímicos, toxinas o daño físico en las células, derivados de trastornos en el organismo o artefactuales (ej. los equinocitos pueden aparecer por almacenamiento prolongado de la muestra de sangre, secado lento de las extensiones o exceso de EDTA). Se ha observado acantocitosis en conejos de laboratorio sanos, y especies como cerdos, cabras y terneros también muestran acantocitos, equinocitos y dacriocitos sin signos de enfermedad.

Un estudio en 482 conejos (403 enfermos) describe poiquilocitosis nula o leve (0-3% eritrocitos) en 52% de animales, moderada (>3-10%) en 19% de animales y marcada (>10%) en 29% de animales; sin observar influencia por la hemólisis de las muestras. En animales sanos se detectó una mayor proporción de acantocitosis y equinocitosis de grado moderado-marcado en hembras; no se observaron diferencias por edad ni raza. Los acantocitos y los equinocitos fueron los poiquilocitos más frecuentes (30% de presencia moderada-marcada de ambos) sin diferencias significativas entre sanos y enfermos. Los procesos inflamatorios y sépticos sí se asociaron a mayor acantocitosis respecto a animales sanos. Se observó fragmentación ligera-moderada en un 5% de animales: todos enfermos y especialmente en procesos inflamatorios infecciosos y neoplasias malignas; posiblemente debido a toxinas bacterianas o microangiopatía. El daño oxidativo y las citoquinas generados por inflamación y sepsis alteran la membrana eritrocitaria, reduciendo su deformabilidad y aumentando la fagocitosis por macrófagos: este estudio mostró correlación entre fragmentación y anemia regenerativa con marcadores de inflamación e infección (heterófilos, monocitos, fibrinógeno y globulinas). La equinocitosis fue más frecuente e intensa en azotemia renal, alteraciones electrolíticas y elevado anion gap; la uremia, hipernatremia e hiperosmolalidad plasmática se han relacionado con equinocitosis en otras especies. Se ha descrito la asociación entre acantocitosis y dietas aterogénicas en conejos; en otras especies las anomalías en colesterol y fosfolípidos por enfermedad hepática o dietas aterogénicas causan menor deformabilidad y mayor fragilidad eritrocitaria (acantocitosis, equinocitosis, esferocitosis), reduciendo la vida media de los glóbulos rojos e induciendo anemia regenerativa.¹⁶

Los trastornos leucocitarios en animales exóticos pueden tener orígenes similares a las especies más habituales: inflamación, hipersensibilidad, procesos infecciosos, neoplasias, tóxicos, estrés, ... Los mecanismos de trombocitosis y trombocitopenia son también, en general, los mismos: disminución en la producción y aumento en el consumo o la destrucción, ya sea por procesos inflamatorios, infecciosos, traumáticos, tóxicos, neoplásicos, inmunomediados, coagulación intravascular diseminada, ...^{3,17}

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ameri M, Schnaars HA, JR Sibley, Honor DJ: Stability of hematologic analytes in monkey, rabbit, rat, and mouse blood stored at 4°C in EDTA using the ADVIA 120 hematology analyzer. *Vet Clin Pathol* 2011; 40(2):188–194.
2. Campbell TW: Exotic Animal Hematology and Cytology, 4th ed, John Wiley and Sons, Inc, 2015: DOI:10.1002/9781118993705.
3. Sykes JM, Klaphake E: Reptile hematology. *Vet Clin Exot Anim*; 2015; 18:63–82.
4. Hanley CS, Hernandez-Divers SJ: Comparison of the effect of dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid and lithium heparin on hematologic values in the Green Iguana (*Iguana iguana*). *J Zoo Wildlife Med* 2004; 35(3):328–332.
5. Harr KE, Raskin RE, Heard DJ: Temporal effects of 3 commonly used anticoagulants on hematologic and biochemical variables in blood samples from macaws and Burmese pythons. *Vet Clin Pathol* 2005; 34:383–388.
6. Fontes Pinto F, Lopes C, Malhão F, Marcos R: Unraveling avian and reptilian hematology: an optical and electron microscopic study of the buffy coat. *Vet Clin Pathol* 2018; 47(3):407–414.
7. Harms CA, Keller JM, Kennedy-Stoskop S: Use of a two-step Percoll gradient for separation of Loggerhead Sea Turtle peripheral blood mononuclear cells. *J Wildlife Dis* 2000; 36(3): 535–540.
8. Welles, EG: Automated in-clinic hematology Instruments for small animal practitioners: what is available, what can they really do, and how do I make a choice? *Vet Clin Exot Anim* 2015; 18:147–155.
9. Samour J: Diagnostic value of hematology. En: Harrison GJ, Lightfoot T (eds): Clinical Avian Medicine, Florida, Spix Publishing, 2006: 587–610.
10. Nogueira de Carvalho MP, Teixeira Queiroz-Hazarbassanov NG, de Oliveira Massoco C, Stefanini Sant'Anna S, Mathias Lourenço M, Levin G, Cleide Sogayar M, Fernandes Grego K, Catao-Dias JL: Functional characterization of neotropical snakes peripheral blood leukocytes subsets: linking flow cytometry cell features, microscopy images and serum corticosterone levels. *Devel Comp Imm* 2017; 74:144–153.
11. Muñoz FA, Franco-Noguez SY, Gonzalez-Ballesteros E, Negrete-Philippe AC, Flores-Romo L: Characterisation of the green turtle's leukocyte subpopulations by flow cytometry and evaluation of their phagocytic activity. *Vet Res Commun* 2014; 38:123–128.
12. Beaufrère H, Ammersbach M, Tully TN: Complete Blood Cell Count in Psittaciformes by Using High-Throughput Image Cytometry: A Pilot Study. *J Avian Med Surg* 2013; 27(3):211–217.
13. Passabom Jacob ML, Mafra Nunes CS, de Oliveira Borba PC, Pereira Ribeiro G, Uggere de Andrade T, Coutinho Endringer D, Lenz D: Hematological value references for free-living saffron finch (*Sicalis flaveola*) using a machine-learning-based classifier. *Comp Clin Pathol* 2018; <https://doi.org/10.1007/s00580-018-2835-x>.
14. Marini RP, Jackson LR, Esteves MI, Andrutis KA, Goslant CM, Fox JG: Effect of isoflurane on hematologic variables in ferrets. *Am J Vet Res* 1994; 55(10):1479–83.
15. Dettweiler A, Klopffleisch R, Müller K: Anaemia in pet rabbits: causes, severity and reticulocyte response. *Vet Rec* 2017; 181(24):656.
16. Christopher MM, Hawkins MG, Burton AG: Poikilocytosis in Rabbits: Prevalence, Type, and Association with Disease. *PlosOne* 2014; 9(11):1–11.
17. Jones, MP: Avian hematology. *Vet Clin Exot Anim* 2015; 18: 51–61.