

SEED Hematologia weterynaryjna



Wykorzystanie wskaźników dojrzałości retikulocytów z analizatorów Sysmex XN-V

Artykuł stworzony przez

Alejandro Pérez-Écija

DVM, MSc, PhD, ECVP certified

Francisco Javier Mendoza García

DVM, MSc, PhD, ECEIM certified

*Katedra Medycyny i Chirurgii Zwierząt, Wydział Medycyny
Weterynaryjnej Uniwersytetu w Cordobie, Hiszpania*

Anemia u psów: różnicowanie i znaczenie właściwej diagnozy

Anemia (rozumiana jako zmniejszenie wartości hematokrytu [HCT], ilości czerwonych krwinek [RBC] i/lub stężenia hemoglobiny [HGB]) jest jednym z najczęściej występujących zaburzeń w praktyce weterynaryjnej małych zwierząt [1]. W przypadku psów anemia może być klasyfikowana na podstawie wielu zmiennych (patrz tabela 1).

Dla lekarza weterynarii najbardziej użyteczna jest klasyfikacja anemii według jej przyczyny. Pozwala to na lepsze spersonalizowanie sposobu leczenia i poprawę prognozy dla pacjenta (patrz tabela 2).

Tab. 1 Rodzaje klasyfikacji anemii wśród psów, w oparciu o różne kryteria

Klasyfikacja wg stopnia nasilenia	<ul style="list-style-type: none"> ■ Łagodna → HCT 30–37% ■ Umiarkowana → HCT 20–29% ■ Poważna → HCT 13–19% ■ Ciężka → HCT < 13%
Klasyfikacja wg morfologii RBC	<ul style="list-style-type: none"> ■ Hipochromiczna lub normochromiczna ■ Mikrocytowa, normocytoowa lub makrocytowa
Klasyfikacja wg odpowiedzi szpiku kostnego	<ul style="list-style-type: none"> ■ Regeneratywna (ostra hemolityczna i krwotoczna) ■ Nieregeneratywna (przewlekłe i podostre krwawienia, uszkodzenie lub supresja szpiku kostnego)

Tab. 2 Klasyfikacja anemii u psów na podstawie przyczyny lub etiologii, z przykładami głównych schorzeń dla każdego podtypu

Anemia pokrwotoczna	<ul style="list-style-type: none"> ■ Uraz ■ Infekcje żołądkowo-jelitowe lub zewnątrzpa-sożytnicze ■ Trombocytopenia, trombocytopatia 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Nowotwór, wrzody lub perforacje żołądkowo-jelitowe ■ Toksyczność warfaryny ■ Inne zaburzenia krzepnięcia
Anemia hemolityczna	<ul style="list-style-type: none"> ■ Idiopatyczna anemia immunohe-molityczna ■ Intoksykacja 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Pasożyty erytrocy-tarne ■ Wrodzone deficyty metaboliczne RBC
Anemia wynikająca z uszkodzenia lub supresji erytropoezy	<ul style="list-style-type: none"> ■ Uszkodzenie szpiku kostnego (infekcje, rak, produkty toksyczne) ■ Anemia chorób przewlekłych 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Choroby nerek ■ Niedobory żelaza

Znaczenie zliczania retikulocytów

Erytropoeza to fizjologiczny proces, który umożliwia wymianę i regenerację erytrocytów krążących w organizmie [2]. Retikulocyt jest ostatnim stadium komórkowym przed uformowaniem się dojrzałej krwinki czerwonej. Produkcja retikulocytów nieprzerwanie odbywa się w szpiku kostnym, z którego po krótkim okresie są uwalniane (w niskim stężeniu) do krwi obwodowej. Następuje tam ostatni etap procesu dojrzewania (utrata resztek RNA, mitochondriów i innych organelli komórkowych).

Głównym wskazaniem do pomiaru krążących retikulocytów (RET) jest różnicowanie pomiędzy niedokrwistością regeneratywną a nieregeneratywną [2]. Wzrost bezwzględnej liczby krążących retikulocytów zazwyczaj wskazuje na obecność anemii regeneratywnej. Jednakże poprzez ustalenie samej liczby retikulocytów nie jest możliwym rozróżnienie ostrego krwotoku od anemii hemolitycznej. W ten sam sposób nie jest możliwe rozróżnienie schorzeń nieregeneratywnych, w których nieefektywna erytropoeza spowodowana jest uszkodzeniem szpiku lub przyczyna znajduje się poza szpikiem kostnym (np. w anemii chorób przewlekłych).

Metody pomiaru retikulocytów

Najbardziej docenianym testem w celu ustalenia liczby retikulocytów u psów jest ich zliczanie po odpowiednim wybarwieniu [3]. Odbywa się to manualnie (z użyciem błękitu metylowego lub brylantowego błękitu krezolowego) lub z użyciem analizatorów automatycznych (które wybarwiają retikulocyty przy użyciu specyficznych fluorochromów w celu wykrycia pozostałości RNA).

Porównując te dwie techniki można zauważyć, że metoda manualna obarczona jest większym błędem statystycznym i w dużej mierze zależy od zdolności osoby oceniającej. Dodatkowo w celu otrzymania wiarygodnej oceny wymaga zliczenia przynajmniej 1000 retikulocytów. Wykorzystanie automatyzacji, np. XN-V, pozwala na szybką ocenę (w czasie poniżej minuty) obecności fluorescencji w liczbie komórek dochodzącej do 30 000 RBC, otrzymując tym samym o wiele lepszą odtwarzalność i dokładniejsze dane, niż w przypadku wykorzystania metod manualnych [4].

Ocena odsetka retikulocytów była tradycyjnie wykorzystywana przez klinicystów do oceny odpowiedzi regeneracyjnej. Należy jednak zaznaczyć, że wykazuje pewne wady w kwestii oceny odpowiedzi szpiku kostnego [2, 3]. Dla przykładu u zdrowego psa odsetek retikulocytów na poziomie 4% uważany jest za wartość podwyższoną, jednakże w przypadku owarzyszającej anemii z liczbą RBC $2 \times 10^6 / \mu\text{l}$ ta sama wartość procentowa będzie oznaczała około 80 000 retikulocytów/ μl (stanowiąca prawidłową wartość u zdrowego zwierzęcia, jednak ekstremalnie niska w przypadku obecności tego stopnia anemii).

Biorąc pod uwagę powyższe, zawsze bardziej efektywna jest ocena stopnia regeneracji w oparciu o wartości bezwzględne retikulocytów, lub alternatywnie o jeden z wielu wskaźników oceny regeneracji opublikowanych dla psów (patrz tabela 3).

Celem wstępnego postępowania zaprezentowanego w tym dokumencie jest ustalenie znaczenia dodatkowych parametrów hematologicznych, oprócz liczby retikulocytów, u anemicznych psich pacjentów. Ma to na celu wspomóc różnicowanie pomiędzy krwotokiem i chorobami hemolitycznymi, które mogą dawać objawy nieregeneratywnej anemii występujące w trakcie różnych schorzeń.

Tab. 3 Główne metody oceny regeneracji szpiku kostnego u psów

	Zalety	Wady	Zakresy referencyjne										
<p>Procentowa liczba retikulocytów</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"> ✓ Dane uzyskane z podstawowego analizatora. 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Brak uwzględnienia stopnia nasilenia anemii, nie jest to użyteczne w ocenie pacjentów anemicznych. 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Do 1% u zdrowych pacjentów ■ U pacjentów anemicznych w zależności od stopnia nasilenia anemii. 										
<p>Bezwzględna liczba retikulocytów</p> $\text{RET}\# = \frac{\text{RET} [\%] \times \text{RBC} [10^6/\mu\text{l}]}{100}$	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Bardziej użyteczne od procentowej liczby przy ocenie zdolności odpowiedzi szpiku kostnego. 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Zazębianie pomiędzy osobnikami zdrowymi i anemią nieregeneratywną. ✗ Brak różnicowania między regeneracją ze względu na hemolizę lub krwotok. 	<ul style="list-style-type: none"> ■ U zdrowych osobników od 20 000 do 150 000/μl ■ Zazwyczaj wyższe w stanach regeneratywnych. 										
<p>Indeks produkcji retikulocytów</p> $\text{RPI} = \frac{\text{RET} [\%]}{\text{Liczba dni dojrzewania retikulocytów}} \times \frac{\text{HCT} [\%]}{0,45}$ <p>W powyższym wzorze „liczba dni dojrzewania retikulocytów” jest zależna od hematokrytu pacjenta:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>HCT pacjenta</th> <th>liczba dni dojrzewania retikulocytów</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 pacjenta	liczba dni dojrzewania retikulocytów	36 – 45 %	1	26 – 35 %	1,5	16 – 25 %	2	≤ 15 %	2,5	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Bardziej użyteczne w przypadkach anemicznych, dzięki uwzględnieniu hematokrytu pacjenta. 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Wskaźnik wywodzi się z medycyny ludzkiej, bez całkowitej standaryzacji zastosowania w medycynie weterynaryjnej. Trudnością może być personalizacja w zależności od danych pacjenta. 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Wartość powyżej 1 jest uważana za oznakę regeneracji.
HCT pacjenta	liczba dni dojrzewania retikulocytów												
36 – 45 %	1												
26 – 35 %	1,5												
16 – 25 %	2												
≤ 15 %	2,5												

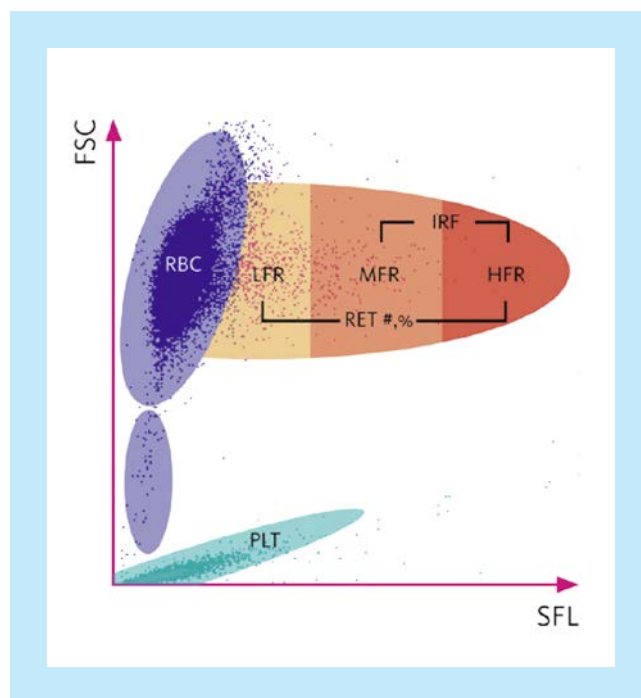
Dojrzewanie retikulocytów: znaczenie i zastosowanie

Analizatory Sysmex XN-V dzięki wykorzystaniu fluorescencyjnej cytometrii przepływowej są w stanie wyznaczyć całkowitą liczbę retikulocytów w krwi krążącej, a także określić ich poszczególne stopnie dojrzałości [5] na podstawie zawartości RNA:

- LFR (retikulocyty o niskiej fluorescencji) lub „dojrzałe” retikulocyty.
- MFR (retikulocyty o pośredniej fluorescencji) lub „średnio dojrzałe” retikulocyty.
- HFR (retikulocyty o wysokiej fluorescencji) lub „niedojrzałe retikulocyty” z wysoką zawartością RNA.

Dodatkowo analizator dostarcza informacje o frakcji niedojrzałych retikulocytów (IRF), które oznaczają sumę frakcji MFR i HFR. Rozkład poszczególnych populacji może także być oceniany poprzez skatergram, który powstaje w trakcie zliczania komórek w kanale RET (rycina 1).

Powyższe parametry są obecnie wykorzystywane w medycynie ludzkiej, również w celu uzyskania początkowej diagnozy i klasyfikacji anemii zgodnie z etiologią [6].



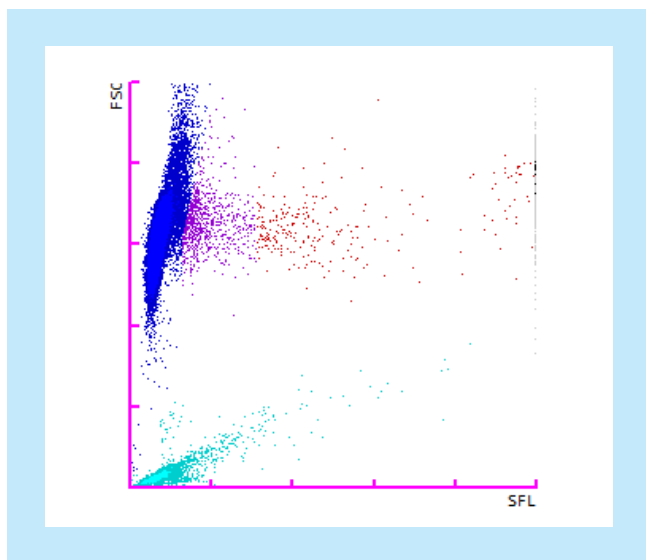
Ryc. 1 Prezentacja frakcji dojrzałości retikulocytów uzyskanych z pomiaru w kanale RET, na analizatorze hematologicznym Sysmex XN-V

Zakresy referencyjne dojrzałości retikulocytów u psów

W celu oceny parametrów dojrzałości retikulocytów potrzebne jest ustalenie ich zakresów referencyjnych u zdrowych psów. Odnosząc się do artykułów, które powstały wcześniej [5], należy pamiętać, że wykorzystywały one inne systemy analizatorów, ograniczoną liczbę pacjentów i skupiały się głównie wokół rasy psów gończych. Zespół badawczy z Uniwersytetu w Cordobie dokonał analizy parametrów retikulocytarnych wśród zwierząt przyjętych do kliniki weterynaryjnej Francisco Santisteban (projekt nadal jest w toku). Poddając wstępnej ocenie 489 psów bez objawów anemii (n = 489), ustalono zakresy referencyjne dla części parametrów retikulocytarnych, które zestawiono w tabeli 4. Dodatkowo na rycinie 2 przedstawiono przykład typowego skatergramu u zdrowego psa.

Tab. 4 Wartości średnie i zakresy referencyjne (95% przedział ufności) parametrów dojrzałości retikulocytów u psów bez stwierdzonej anemii (n=489)

	LFR	MFR	HFR	IRF
Średnia (%)	75,4	9,8	14,5	24,6
Zakresy referencyjne (%)	60–88	4–16	5–26	11–39

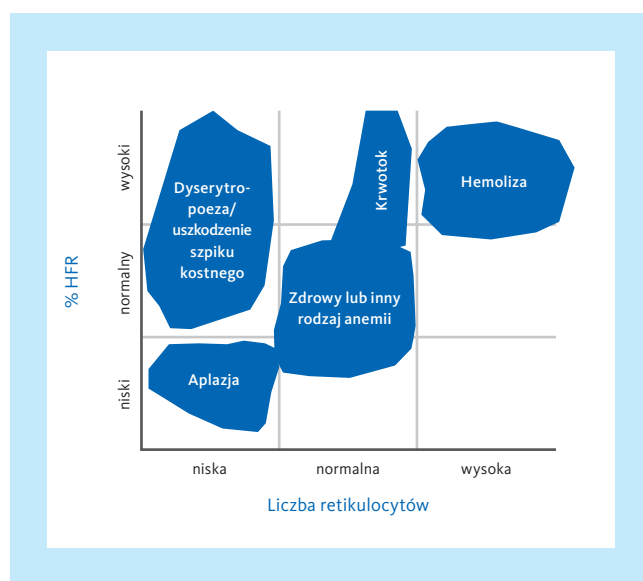


Ryc. 2 Skatergram uzyskany z pomiaru w kanale RET u psa bez anemii

Badanie obejmowało zwierzęta obu płci, z 45 różnych ras, w wieku od 7 dni do 15 lat. Po wstępnej analizie statystycznej nie stwierdzono wpływu płci, rasy lub wieku pacjentów, jednak dane są nadal gromadzone i analizowane.

Interpretacja diagnostyczna dojrzałości retikulocytów u anemicznych psów: diagram Écija-Mendoza

W celu oceny zdolności parametrów retikulocytarnych do różnicowania pomiędzy różnymi typami psiej anemii, zespół badawczy Uniwersytetu w Cordobie przeanalizował je u 153 anemicznych pacjentów (n = 153) z potwierdzoną diagnozą etiologiczną. Po analizie statystycznej danych stworzono specyficzny diagram diagnostyczny dla anemicznych psów (patrz rycina 3).



Ryc. 3 Diagram Écija-Mendoza obrazujący klasyfikację różnych etiologii anemii na podstawie procentowej ilości HFR i zagęszczenia retikulocytów

Diagram Écija-Mendoza przedstawia zarówno HFR (wysokie wartości stanowią powyżej 25%, a niskie poniżej 5%) jak i ilość retikulocytów (wysokie wartości stanowią powyżej 150 000, a niskie poniżej 20 000/ μ l). Obejmuje on różne pola diagnostyczne, które umożliwiają skierowanie podejrzeń i różnicowanie pomiędzy obecnością hemolizy, krwotoku lub uszkodzenia szpiku kostnego. Tabela 5 przedstawia dane dotyczące czułości, swoistości i diagnostycznych wartości predykcyjnych dla każdej z wcześniej wspomnianych przyczyn anemii, z użyciem wstępnych wartości cut-off ustalonych przez zespół badawczy z Uniwersytetu w Cordobie.

Należy zaznaczyć, że w przedstawionym dokumencie prezentowane są wstępne dane, a zespół badawczy z Uniwersytetu w Cordobie kontynuuje zbieranie wyników i proces ich statystycznej oceny, tak aby ulepszyć prezentowane narzędzie diagnostyczne. Dodatkowo przedstawiony diagram nie zastępuje innych badań potwierdzających etiologię. Jego celem jest raczej wsparcie procesu diagnostycznego poprzez szybkie i łatwe różnicowanie pomiędzy krwotokiem, hemolizą a uszkodzeniem szpiku kostnego.

Tab. 5 Potencjał diagnostyczny diagramu Écija-Mendoza, na podstawie dostępnych danych statystycznych (sierpień 2020)

Etiologia i liczba przypadków	HFR	Liczba retikulocytów	Swoistość diagnostyczna*	Czułość diagnostyczna**	Przykłady zaburzeń
Hemoliza (n = 50)	Wysoki (≥ 26%)	Wysoki (≥ 150 000/μl)	92%	76%	Anemia immunohemolityczna (idiopatyczna i wtórna), babeszjoza itp.
Ostry krwotok (n = 25)	Normalny-wysoki (≥ 21%)	Normalny-wysoki (100 000 – 150 000/μl)	97%	72%	Trauma, intoksykacja środkami kumarynowymi, inne zabudzenia krzepnięcia
Aplazja szpiku kostnego (n = 15)	Niski (≤ 5%)	Niski (≤ 20 000/μl)	99%	87%	Zakażenie wirusowe (parwowirusy, itp.), toksykacja (chemioterapia itp.)
Inne rodzaje dyserytropoezy włącznie z uszkodzeniem szpiku kostnego (n = 15)	Normalny-wysoki (> 5%)	Niski (≤ 20 000/μl)	99%	80%	Białaczka (granulocytowa, limfocytowa), schyłkowa niewydolność nerek itp.

*Swoistość diagnostyczna wskazuje zdolność algorytmu do wykluczenia czynnika etiologicznego jeśli pacjent prezentuje inne wartości HFR i retikulocytów [7].
Dla przykładu: 92% pacjentów niezaklasyfikowanych jako hemolityczni rzeczywiście nie będzie posiadać hemolizy.

**Czułość diagnostyczna wskazuje zdolność algorytmu do rozpoznawania czynnika etiologicznego anemii w oparciu o HFR i ilość retikulocytów [7].
Dla przykładu: 76% pacjentów, którzy spełniają kryteria klasyfikacji do „hemolizy” rzeczywiście będzie posiadać hemolizę.

Wnioski końcowe

Wczesne różnicowanie podłoża anemii u psów jest jednym z większych wyzwań diagnostycznych, z którymi obecnie zmagają się lekarze weterynarii. Dokładna i wiarygodna liczba retikulocytów, wraz z badaniem różnych stadiów dojrzałości krążących komórek, może umożliwić o wiele lepszą i dokładniejszą ocenę każdego pacjenta w gabinecie weterynaryjnym. W opisanym badaniu wstępnym ustalono zakresy referencyjne dla różnych frakcji dojrzałości retikulocytów (LFR, MFR, HFR, IRF) na analizatorze XN-V. Po ocenie ponad 150 stwierdzonych przypadków anemii utworzono diagram Écija-Mendoza. To narzędzie diagnostyczne, które pozwala na różnicowanie pomiędzy schorzeniami spowodowanymi przez hemolizę, ostry krwotok i anemię wskutek dyserytropoezy. Algorytm nie zastępuje ostatecznych badań potwierdzających diagnozę etiologii, jednak czułość i swoistość w proponowanych kategoriach pozwala klinicyście na szybkie nakierowanie się na podejrzaną diagnozę.

Źródła

- [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 haematology: 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.