

# Utilidad del hemograma en la clínica equina

**Rafaela Cuenca Valera, Josep Pastor Milán**

Patología General y Médica - Facultad de Veterinaria - Universidad Autónoma de Barcelona

## Resumen

Una de las pruebas laboratoriales más empleadas por el veterinario especialista en medicina equina actualmente es el hemograma, debido a la facilidad y rapidez de su realización y a la excelente relación entre su coste y la información proporcionada.

Los componentes celulares de la sangre pueden reflejar un cambio específico producido en un órgano o sistema corporal o, con más frecuencia, reflejan una respuesta general del individuo frente a la enfermedad.

En este trabajo revisamos las técnicas analíticas que se utilizan para valorar los diferentes parámetros del hemograma, así como la interpretación de los mismos. Se exponen también las aportaciones que los nuevos analizadores hematológicos automatizados han traído consigo, contribuyendo a mejorar la precisión y exactitud de los parámetros analizados y a abrir nuevas expectativas sobre la utilidad práctica de otros parámetros menos conocidos.

La función principal de las pruebas laboratoriales entre las que se encuentra el hemograma, es la de generar una información que ayude al clínico en los procesos de diagnóstico, toma de decisiones, formulación del pronóstico y manejo y control del paciente (Rowan, 1999). Incluso para los clínicos con experiencia que con frecuencia son capaces de hacer diagnósticos seguros sin contar con pruebas laboratoriales, entre ellas el hemograma, el uso adecuado del mismo le proporciona una dimensión añadida en la práctica clínica.

El hemograma, dentro de las pruebas laboratoriales, es quizá una de las que más se utiliza debido a la facilidad y rapidez de su realización y a la excelente relación entre su coste y la información que proporciona. A este respecto, sólo en contadas ocasiones un hemograma completo sirve como método diagnóstico para una enfermedad concreta; con mucha más frecuencia refleja la condición general del individuo o su respuesta general frente a la enfermedad (Kidd, 1991).

Los resultados del hemograma han de interpretarse teniendo siempre en cuenta el paciente (edad, raza, sexo, aptitud, tratamientos médicos instaurados, etc.) y los resultados de la exploración clínica que se le ha realizado. La forma en la que la muestra se haya recogido y manejado, y la metodología empleada en la determinación de los diferentes parámetros, puede, influir también en los resultados obtenidos y, por tanto, en su interpretación.

De todas las variables mencionadas, sin duda las que generan una mayor causa de variación son la edad y el estado emocional del animal (Tablas 1 y 2).

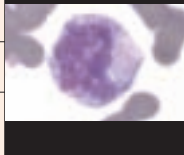
Los équidos domésticos presentan entre sí tan sólo diferencias hematológicas sutiles (Archer y Jecott, 1977). La única

diferencia evidente entre los caballos derivados del árabe, denominados de “sangre caliente” y los caballos de tiro y *ponies*, o de “sangre fría”, es un hematocrito ligeramente superior en descanso en los primeros (Tabla 3).

La muestra de sangre se ha de recoger con el animal en descanso, antes de realizar ejercicio, y bajo unas condiciones que disminuyan al máximo la probabilidad de causarle temor o excitación. Con ello se minimiza el efecto de la contracción esplénica (elevaría el valor hematocrito, el recuento de eritrocitos y la concentración de hemoglobina), y la liberación de adrenalina o corticosteroides (provocan modificaciones en el leucograma). El temperamento del caballo y la técnica empleada en la extracción pueden tener un efecto importante tanto en los valores eritrocitarios como leucocitarios del hemograma (Archer y Clabby, 1965; Stewart *et al.*, 1970).

La extracción sanguínea se ha de realizar, siempre que sea posible, con el animal en ayunas, para evitar la lipemia postprandial que puede interferir con los resultados de otras determinaciones y provocar la hemólisis *in vitro* de la muestra. Se debería evitar recoger la muestra de sangre en las tres horas inmediatas a la administración de una comida rica en concentrados o una ración de heno, puesto que en este intervalo se produce un incremento importante en el valor hematocrito y también un incremento del 12% en la concentración de proteínas plasmáticas (Kerr y Snow, 1982) debido al aumento de la producción salivar y a la desviación de líquidos desde la circulación al tracto gastrointestinal (Clarke *et al.*, 1990; 1998).

Las muestras de sangre se recogen normalmente en tubos de cristal en vacío, con la sal del ácido etilén diaminotetracético (EDTA) como anticoagulante, que prolonga el tiempo en el que la morfología



**Tabla I. Valores hematológicos de referencia en potros**

Parámetros	Nacimiento	24 horas	7 días +
Recuento de eritrocitos ( $\times 10^{12}/L$ )	9,0-13,0	8,0-11,0	7,5-10,5
Concentración de hemoglobina (g/L)	120-180	130-155	115-175
Valor hematocrito (L/L / %)	0,40-0,52	0,34-0,46	31-40
Volumen Corpuscular Medio (fl)	--	37-49	--
Concentración Corpuscular Media de Recuento total de leucocitos ( $\times 10^9/L$ )	5,5-11,5	--	7,0-12,0
Recuento diferencial de leucocitos			
Linfocitos ( $\times 10^9/L$ )	1,8-3,0	1,8-3,0	2,0-4,0
Monocitos ( $\times 10^9/L$ )	--	0,2	--
Neutrófilos ( $\times 10^9/L$ )	3,5-10,0	3,0-9,6	7,0-10,0
Eosinófilos ( $\times 10^9/L$ )	--	0,0-0,1	--
Basófilos ( $\times 10^9/L$ )	--	0,1	--
Recuento de plaquetas ( $\times 10^9/L$ )	100-250	125-300	100-400

Datos obtenidos de Knottenbelt, D. C. ; Holdstock, N. y Madigan, J. E. (2004).

**Tabla II. Valores hematológicos de normalidad en potros Pura Sangre y Cuarto de Milla de ambos sexos (media  $\pm$  1SD)**

Parámetros	1er día	2-7 días	8-14 días	21-30 días	1-3 meses
	n=34	(promedio 5) n=16	(promedio 9) n=15	(promedio 28) n=8	(promedio 51) n=14
Recuento de eritrocitos ( $\times 10^6/\mu L$ )	10,5 $\pm$ 1,4	9,5 $\pm$ 0,8	9,0 $\pm$ 0,8	11,2 $\pm$ 1,3	11,9 $\pm$ 1,3
Concentración de hemoglobina (g/dL)	14,2 $\pm$ 1,3	12,7 $\pm$ 0,9	11,8 $\pm$ 1,2	13,1 $\pm$ 1,1	13,4 $\pm$ 1,6
Valor hematocrito (%)	41,7 $\pm$ 3,6	37,1 $\pm$ 2,8	34,9 $\pm$ 3,7	37,8 $\pm$ 3,3	38,3 $\pm$ 4,1
VCM (fl)	40,1 $\pm$ 3,8	39,2 $\pm$ 2,8	39,1 $\pm$ 2,2	34,2 $\pm$ 0,4	32,4 $\pm$ 1,9
CCMH (%)	9,602 $\pm$ 3,372	9,300 $\pm$ 2,346	9,483 $\pm$ 2,196	9,688 $\pm$ 1,940	10,893 $\pm$ 2,977
Recuento total de leucocitos $/\mu l$					
Recuento diferencial de leucocitos					
Linfocitos	2,192 $\pm$ 891	2,420 $\pm$ 739	2,633 $\pm$ 933	3,823 $\pm$ 863	5,086 $\pm$ 1,419
Monocitos	414 $\pm$ 373	308 $\pm$ 172	302 $\pm$ 124	266 $\pm$ 192	348 $\pm$ 175
Neutrófilos	6,824 $\pm$ 2,757	6,448 $\pm$ 2,128	6,338 $\pm$ 1,849	5,501 $\pm$ 1,346	5,315 $\pm$ 2,437
Eosinófilos	0	30 $\pm$ 34	21 $\pm$ 38	48 $\pm$ 53	115 $\pm$ 88
Basófilos	14 $\pm$ 78	41 $\pm$ 44	29 $\pm$ 50	11 $\pm$ 29	12 $\pm$ 2

Datos obtenidos de Feldman, B. F.; Zinki, J. G. y Jain, N. C. (2000).

**Tabla III. Rangos hematológicos de normalidad para el caballo**

Parámetros	Razas de “Sangre Caliente” (Basado en 147 caballos clínicamente normales)	Razas de “Sangre Fría” (Recogido de la literatura)
Recuento de eritrocitos ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	6,8-12,9	5,5-9,5
Concentración de hemoglobina (g/dL)	11,0-19,0	8,0-14,0
Valor hematocrito (%)	32,0-53,0	24-44
VCM (fl)	37,0-58,5	--
CCMH (%)	31,0-38,6	--
Recuento total de leucocitos/ $\mu\text{l}$	5.400-14.300	6.000-12.000
Recuento diferencial de leucocitos		
Linfocitos	15.000-7.700	--
Monocitos	0-1.000	--
Neutrófilos	2.260-8.580	--
Eosinófilos	0-1.000	--
Basófilos	0-290	---

Datos obtenidos de Feldman, B. F.; Zinkl, J. G. y Jain, N. C. (2000).

celular se mantiene intacta. Dado que el EDTA puede causar pseudotrombocitopenia (Hinchcliff *et al.*, 1993) se puede recoger también un tubo adicional en citrato sódico para asegurar la fiabilidad del recuento plaquetario. El análisis debe realizarse tan pronto como sea posible tras la recogida, puesto que los componentes celulares de la sangre sufren cambios degenerativos a las pocas horas. Si el examen no puede realizarse rápidamente es mejor hacer una extensión sanguínea y adjuntarla al tubo de sangre para asegurar, al menos, que los cambios que se observan en la extensión no son variaciones provocadas por el almacenaje.

El hemograma comprende la cuantificación de los componentes sanguíneos, así como la observación de las alteraciones en su composición o morfología. En su estudio

se incluye el recuento de eritrocitos, el valor hematocrito, la concentración de la hemoglobina, el volumen corpuscular medio (VCM), la concentración corpuscular media de hemoglobina (CCMH), el recuento total y diferencial de leucocitos, el recuento de plaquetas y el estudio de la morfología celular en las tres líneas.

Los recuentos celulares de eritrocitos, leucocitos y plaquetas se pueden realizar de forma manual con cámara hemocitométrica de Neubauer y distintos diluyentes o bien de forma automatizada mediante contadores celulares (véase a continuación) que han aumentado la fiabilidad de los resultados obtenidos y disminuido el tiempo empleado en el análisis. El número de plaquetas en el caballo es relativamente bajo, comparado con el de otras especies (Fig. 1).



Figura 1. Plaquetas 100X, Diff-Quick.

El recuento manual en cámara lleva asociado un error que puede oscilar entre el 10-25%, según la serie celular. Con la utilización de los métodos electrónicos los recuentos pueden verse sometidos a grandes errores sobre todo si no se realiza un control diario y una calibración periódica del analizador.

### VALOR HEMATOCRITO

Este parámetro es especialmente útil en el caballo puesto que permite valorar y controlar el estado de hidratación de un animal con síntomas de cólico, proceso que es frecuente en esta especie. El valor hematocrito se define como el volumen que ocupan los eritrocitos contenidos en 100 ml de sangre (expresado en porcentajes). Se obtiene al centrifugar la sangre con anticoagulante en un capilar de microhematocrito para conseguir la separación de ésta en sus tres componentes principales. La sangre se ha de centrifugar aproximadamente entre 12.000-15.000 rpm durante 5'. En la parte distal del tubo se acumulan los glóbulos rojos, separados del plasma por una capa delgada blanco-grisácea que incluye los leucocitos y las plaquetas. En la parte superior la apariencia macroscópica del plasma, permite obtener información adicional al poder detectar si existe

ictericia, hemólisis o lipemia. Éste es el método considerado *goal standard* para esta determinación.

El valor hematocrito es el parámetro más fiable del hemograma al estar sujeto a menor error técnico que el recuento eritrocitario y la concentración de hemoglobina. Sin embargo, es un parámetro muy poco estable en el animal, especialmente en razas equinas muy excitables. La contracción esplénica, cuando se produce, hace que en cuestión de minutos entre "en masa" en el torrente circulatorio un gran reservorio de eritrocitos que normalmente están secuestrados en este órgano (pueden producirse incrementos superiores al 15%).

Los contadores hematológicos electrónicos dan un valor hematocrito al que se le denomina *packed cell volumen* (PCV), que se calcula matemáticamente a partir del número de eritrocitos que el aparato detecta y de su tamaño (VCM).

### CONCENTRACIÓN DE HEMOGLOBINA

La hemoglobina se determina espectrofotométricamente mediante el método de la cianometahemoglobina. Los contadores hematológicos actualmente disponibles en el mercado también utilizan este método.

La hemoglobina ocupa aproximadamente un tercio del volumen eritrocitario; por lo tanto, en la mayor parte de las muestras sanguíneas, el valor que se obtenga dividiendo el hematocrito por tres se aproximará al contenido de hemoglobina en el animal.

Cuando las muestras presenten hemólisis, lipemia o un alto número de cuerpos de Heinz, hay que tener cuidado en la interpretación del parámetro, puesto que en estas situaciones varían las propiedades ópticas de la sangre y las lecturas que se realizan de la hemoglobina no son fiables.

## VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO Y CONCENTRACIÓN MEDIA DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR

El VCM da idea del tamaño medio de los eritrocitos. Los equinos tienen un VCM de 44-54 fL. LA CMHC expresa la relación entre el peso de la hemoglobina y el volumen de los eritrocitos y es un parámetro muy semejante en todas las especies domésticas. Los nuevos contadores hematológicos de rayo láser miden el VCM automáticamente, y el valor de la CMHC lo miden directamente del análisis célula a célula, aunque también se puede calcular matemáticamente:

$$\text{VCM (fl)} = \text{PCV\%} : \text{n.º eritrocitos} \times 10^6 / \mu\text{l} \times 10$$

$$\text{CMHC (g/dl)} = \text{Hb (g/dl)} : \text{PCV\%} \times 100$$

Estos parámetros, que principalmente en pequeños animales ayudan a valorar la respuesta medular frente a las anemia, son menos útiles en la especie equina puesto que, a diferencia de los primeros, en el caballo no se produce la liberación de eritrocitos inmaduros y nucleados en sangre ante una anemia. El VCM y la CCMH se consideran indicadores poco sensibles de regeneración periférica, puesto que se requiere de un gran número de eritrocitos macrocíticos e hipocrómicos para detectar modificaciones en sus valores. El VCM en un caballo anémico podría aumentar algo, antes de que el valor hematocrito se incremente (Weiser *et al.*, 1983). Este cambio, de pequeña magnitud, se demuestra con mayor claridad cuando se utilizan analizadores automáticos que producen eritrogramas donde se muestra la distribución del tamaño de los eritrocitos (Brown and Darien, 1989).

## FROTIS SANGUÍNEO

La evaluación morfológica celular en la extensión de sangre es una parte

importante del hemograma que sirve para identificar anomalías no documentadas en los valores cuantitativos obtenidos. La lectura de la extensión de sangre se ha de hacer de forma sistematizada para evitar pasar por alto algún detalle importante.

A pocos aumentos, utilizando el objetivo de x10 se observan los bordes de la preparación para buscar parásitos, células parasitadas, grandes células atípicas y agregación plaquetar o leucocitaria. En esta zona de la extensión las células suelen estar deformadas o incluso rotas.

La zona adecuada para realizar el recuento diferencial es aquella en la que los eritrocitos están muy cercanos, tocándose pero sin llegar a superponerse. En el cuerpo de la preparación las células tienden a amontonarse, siendo difícil apreciar los detalles.

Con el objetivo de x40 se puede obtener una impresión del recuento de leucocitos (bajo, normal o alto) y podríamos realizar el recuento diferencial leucocitario, aunque ciertas células se deben identificar con el objetivo de inmersión. Finalmente, con este último objetivo se lleva a cabo el diferencial leucocitario, se examina la morfología celular y se realiza, si es necesario, una estimación del número de plaquetas.

## Serie eritrocitaria

Los eritrocitos del caballo tienen forma discoide bicóncava, y un tamaño de 5-6  $\mu\text{m}$  de diámetro. De forma fisiológica se observa la presencia de *rouleaux* o “pilas de moneda”, hileras de eritrocitos superpuestos los unos a los otros (Fig. 2), lo que genera que la sangre de esta especie sedimente de forma rápida y que los eritrocitos se separen más rápidamente del plasma en las muestras anticoaguladas, que en otras especies.

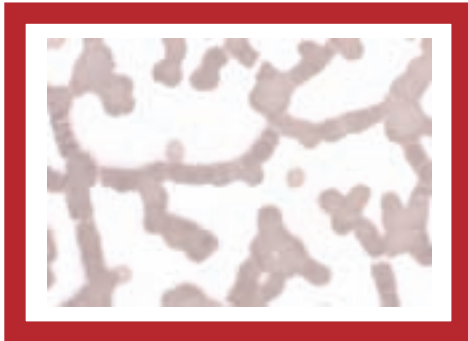


Figura 2. Pilas de moneda 100X, Diff-Quick.

Entre los cambios morfológicos que se pueden observar en los eritrocitos equinos (Latimer y Andreasen, 2002; Prasse *et al.*, 1981; Korbutiak y Schneiders, 1994) destacamos los siguientes:

- *Hipocromia*. Son eritrocitos con una zona aumentada de palidez central, indicativos de una deficiencia de hierro. En el caballo, la pérdida crónica de sangre a través del tracto gastrointestinal, producida por parasitación, es probablemente la causa más frecuente de la deficiencia en hierro.
- *Anisocitosis*. Indica la presencia de eritrocitos de diferentes tamaños. Tiene poca importancia para el clínico porque tan sólo informa de la existencia de algún cambio morfológico que debe ser detectado.
- *Policromasia*. No se observa en los frotis sanguíneos de caballo puesto que, como se ha mencionado anteriormente, los équidos no liberan de forma temprana eritrocitos inmaduros de la médula ante una situación de anemia. Indica la presencia de eritrocitos jóvenes que han sido liberados de forma temprana y que se tiñen de tonalidad más azulada a las células maduras por la presencia de organelas como ribosomas y mitocondrias.
- *Esquistocitos*. Son fragmentos de eritrocitos que se producen por desgarro de éstos, debido a un trauma intravascular. Aparecen en animales con neoplasias muy vascularizadas (hemangiosarcoma), con coagulación intravascular diseminada o bien en las deficiencias por hierro.
- *Acantocitos*. Son eritrocitos espiculados que presentan una serie de proyecciones de superficie distribuidas de forma no uniforme. Se producen por alteraciones en la concentración de fosfolípidos-colesterol a nivel de la membrana eritrocitaria.
- *Equinocitos* (crenación). Son eritrocitos que presentan numerosas proyecciones en la superficie, cortas, puntiagudas y uniformes en cuanto al tamaño y la forma. Su formación puede ser artefactual o estar asociada a enfermedad renal, linfoma, picadura de serpiente o producirse en respuesta al ejercicio (Weiss *et al.*, 1994) asociado aparentemente con alteraciones electrolíticas, especialmente hiponatremia.
- *Esferocitos*. Son eritrocitos que se tiñen de una tonalidad más intensa a la normal porque tienen un área de superficie disminuida respecto al volumen, como resultado de una fagocitosis parcial producida por la presencia de anticuerpos o complemento en su superficie. Su presencia en la sangre equina no se detecta con facilidad al ser los eritrocitos equinos más pequeños y no tener una palidez central tan evidente como los eritrocitos caninos. Su presencia sugiere una anemia hemolítica inmunomediada, producida en el potro

- ocasionalmente como consecuencia de la isoeritrolisis neonatal.
- *Cuerpos de Heinz*. Son inclusiones pequeñas, excéntricas, de hemoglobina precipitada que protruyen ligeramente desde el margen celular, provocadas por un daño oxidativo debido a la exposición a agentes oxidantes. Se forman por la desnaturalización oxidativa de la hemoglobina y su presencia hace que las células sean menos deformables y, por tanto, más susceptibles a la hemólisis. Cuando se tiñen con una tinción vital como el nuevo azul de metileno, aparecen de color azul, más evidentes que en las tinciones Romanowsky. Se pueden formar por la ingesta de plantas de la familia *Allium* (cebollas y ajos silvestres), de hojas secas de arce (*Acer rubrum*), o como consecuencia de la administración de fenotiacina o azul de metileno (Carlson, 2002; Boyer *et al.*, 2002).
  - *Eccentricitos*. Son eritrocitos que tienen una zona del citoplasma clara y la restante ocupada por Hb condensada. Son también indicativos de una exposición a agentes oxidantes y se cree que se forman por alteraciones de la membrana eritrocitaria (Stockham *et al.*, 1994).
  - *Aglutinación*. Los eritrocitos aparecen agregados de forma irregular, como racimos de uva, indicativo de anemia hemolítica inmunomediada (AHIM), que puede estar inducida por la administración de fármacos, causada por infecciones por *Clostridium* o bien ser idiopáticas. Es importante distinguir esta alteración en la que los eritrocitos se agregan de forma desorganizada, de las pilas

de moneda, características de la sangre de esta especie. Para ello se mezcla una parte de sangre con 4-5 partes de solución salina, que deshará las pilas, pero no la aglutinación.

- *Cuerpos de Howell-Jolly*. Son remanentes nucleares, pequeños, redondos y de color púrpura. Un incremento de su concentración se produce en los casos de anemias regenerativas, esplenectomía y supresión de la función esplénica.
- *Inclusiones*. *Babesia caballi*, *Theileria equi* y *Ehrlichia spp.*

### Serie leucocitaria

La morfología de los leucocitos equinos es similar en muchos aspectos a la de otras especies. Las membranas nucleares de los neutrófilos son más irregulares que las de otras especies, dándole a estos núcleos una apariencia multilobulada que no debe confundirse con hipersegmentación. Los monocitos son similares a los de otras especies. Aparecen tanto linfocitos pequeños como de tamaño moderado. Los linfocitos son células de vida larga (de semanas a años) que recirculan entre los tejidos linfoides y la sangre. El eosinófilo es característico, debido a sus múltiples y grandes gránulos de color rosa-anaranjado. Los basófilos se reconocen con facilidad por sus gránulos múltiples de color púrpura (Figs. 3 a 7).

- *Cambios tóxicos*. Los PMNs tóxicos presentan cambios morfológicos causados normalmente por infecciones bacterianas. Entre estos cambios está la granulación tóxica. Su presencia en el caballo sugiere infecciones por bacterias gram negativas o anomalías intestinales que generan una absorción alta de endotoxinas.

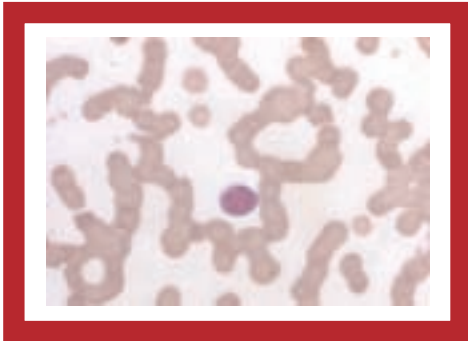
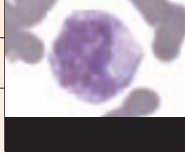


Figura 3. Linfocito 100X, Diff-Quick.

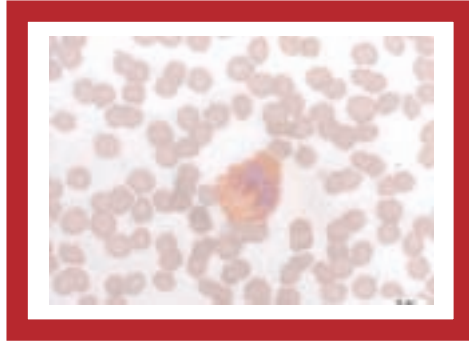


Figura 6. Eosinófilo 100X, Diff-Quick.

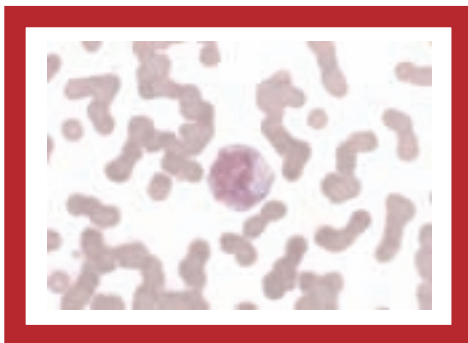


Figura 4. Monocito 100X, Diff-Quick.

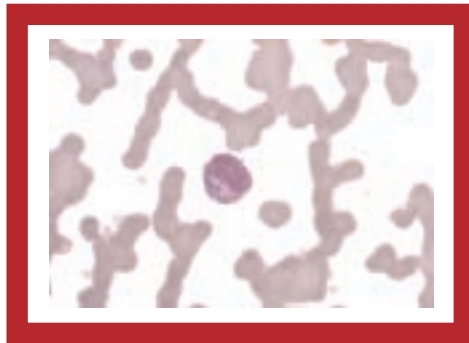


Figura 7. Basófilo 100X, Diff-Quick.

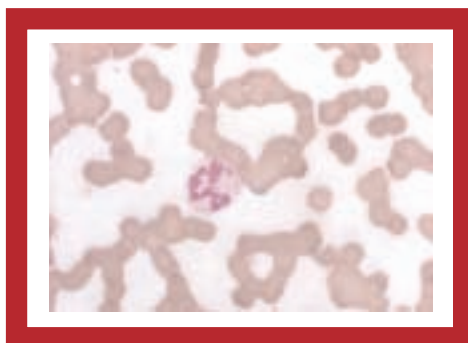


Figura 5. Polimorfonuclear neutrófilo 100X, Diff-Quick.

- **Hipersegmentación.** Es el resultado de un tiempo de tránsito aumentado de los neutrófilos en sangre; la mayoría de veces por administración de corticoides o su liberación endógena. El núcleo del PMN presenta

cinco ó más lóbulos unidos por filamentos finos.

- **Linfocitos reactivos.** Presentan una cantidad aumentada de citoplasma azul oscuro y, en ocasiones, una zona perinuclear clara. Se producen cuando hay estimulación antigénica.

En ocasiones se pueden observar en las extensiones de sangre mórulas de *Ehrlichia ewingi*, que aparecen en PMNs y en ocasiones en los eosinófilos; o bien *E. risticii*, que se presenta en monocitos y linfocitos. Aparecen como cuerpos de inclusión pleomórficos de color azul grisáceo a azul oscuro.

### Interpretación leucocitaria

Durante el primer año de vida el recuento total de leucocitos no cambia de

forma significativa, pero si lo hacen los diferentes tipos leucocitarios. A medida que el potro madura, el recuento de neutrófilos tiende a disminuir y el de linfocitos y eosinófilos a aumentar (alcanza la meseta a los seis meses). Desde los ocho meses hasta uno o dos años, la relación N:L es de 1:1; luego el número de linfocitos disminuye lentamente y la ratio N:L aumenta gradualmente hasta alcanzar 2:1 en caballos de mayor edad.

En el caballo se pueden observar tres respuestas leucocitarias:

- *Leucocitosis fisiológica*, bastante frecuente en caballos de menos de dos años. En esta situación se incrementa el número de PMNs maduros y/o linfocitos (Rossdale *et al.*, 1982). Se produce por la liberación de adrenalina como consecuencia del temor, la excitación o el ejercicio físico, que provocan un aumento de la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca y generan una contracción esplénica. La respuesta se produce en segundos y se observa sobre todo en animales muy nerviosos. Es transitoria, puesto que tras 20-30' de producido el estímulo, la cifra de PMNs vuelve a la normalidad. La de linfocitos tarda aproximadamente una hora.

Otras situaciones en las que se puede producir neutrofilia son en las leucocitosis mediadas por corticoides o las generadas en procesos inflamatorios, si bien en este último caso la neutrofilia es persistente y no transitoria como la de la leucocitosis fisiológica.

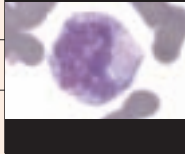
Las linfocitosis se pueden generar también en casos de estimulación antigénica crónica (enfermedades víricas) o en la insuficiencia adrenocortical.

- *Leucocitosis en respuesta a corticoides*, se caracteriza por neutrofilia (normalmente sin desviación a la izquierda) y linfopenia, con eosinopenia. El recuento total de leucocitos no suele exceder de 20.000/ $\mu$ l. La respuesta está causada por la administración de corticoides exógenos o su liberación endógena y se produce entre las dos y cuatro horas, desapareciendo a las 24 horas de haberse eliminado el estímulo.

Cuando se presenta esta respuesta hay que considerar también que el animal puede tener un proceso inflamatorio crónico, donde hay neutrofilia con estrés asociado que genera linfopenia. Otras pruebas laboratoriales confirmarán o descartarán una u otra situación.

Otras causas de linfopenia, pueden ser las infecciones sistémicas agudas, las enfermedades víricas agudas (herpesvirus, *influenza*) o la pérdida de linfocitos en las cavidades corporales.

- *Leucocitosis de la respuesta inflamatoria*, el indicador más sensible y específico de inflamación en el caballo es la presencia de un número alto de neutrófilos inmaduros circulantes. En una respuesta inflamatoria se puede ver leucocitosis, leucopenia o un número normal de leucocitos circulantes, dependiendo del equilibrio entre la demanda tisular y/o el secuestro inducido por endotoxinas y el nivel de producción de PMNs en la médula. Si la producción medular excede el nivel de demanda tisular o de secuestro se produce una leucocitosis y neutrofilia. Si se genera la situación inversa el resultado es una leucopenia con neutropenia. Si, finalmente, la demanda o el secuestro son similar a la producción



de la médula ósea, el recuento de leucocitos y neutrófilos podría ser normal.

En la especie equina, la leucopenia y neutropenia se producen con frecuencia en problemas gastrointestinales en individuos adultos (salmonelosis, impactación grave, estrangulación, etc.) y en los problemas gastrointestinales y las septicemias, normalmente por microorganismos gram negativos, en potros. En estas situaciones se produce una demanda intensa de neutrófilos por parte de los tejidos y/o una endotoxemia grave que genera, marginación de los neutrófilos en los pequeños vasos.

En estos casos es frecuente observar neutrófilos tóxicos, debido a la participación de bacterias y sus toxinas en la patogenia de la leucopenia.

Otras causas de neutropenia, acompañada con frecuencia de linfopenia, son las enfermedades víricas agudas como la arteritis, la infección por herpesvirus 1 -EHV 1- y la anemia infecciosa equina (Duncan y Prasse, 1986). La neutropenia se produce también en la ehrlichiosis granulocítica (Madigan y Gribble, 1987) y durante las primeras fases de la ehrlichiosis monocítica.

La monocitosis se produce durante la inflamación crónica, especialmente aquellas que se asocian a necrosis tisular (Jain, 1986; Tyler *et al.*, 1987).

La situación de eosinofilia se produce en enfermedades de origen alérgico (dermatitis por *Culicoides*) o parasitario (vermes pulmonares y áscaris). Los estados intraluminales de los parásitos gastrointestinales no

suelen inducir eosinofilia (Jain, 1986); sí lo hace en cambio la migración larvaria, sobre todo si es masiva.

## Fibrinógeno

El fibrinógeno es una proteína de fase aguda que suele utilizarse junto con el leucograma para valorar la inflamación. Su determinación resulta especialmente útil cuando el proceso inflamatorio no se acompaña de cambios en el leucograma. No obstante, no todos los procesos inflamatorios cursan con aumento de fibrinógeno, por lo que un valor normal de dicho parámetro no permite descartar la inflamación. El intervalo de referencia en équidos va de 100-400 mg/dl. Su concentración plasmática empieza a aumentar a las 48 horas del inicio de la inflamación y alcanza un pico máximo (que puede exceder los 1.000 mg/dl) entre los cinco y siete días.

## Aportaciones de los nuevos analizadores

La necesidad de producir resultados fiables, que a su vez sean efectivos en tiempo y coste, ha impulsado el desarrollo de sistemas hematológicos automatizados, puesto que el recuento manual tiene poca precisión (ICSH, 1994). Los nuevos analizadores hematológicos tienen una alta reproductividad y exactitud respecto a los recuentos manuales puesto que evalúan miles de células de cada muestra.

En 1956, durante la Conferencia Anual Electrónica de Chicago, USA, se presentó un sistema de recuento basado en una medida de resistencia o conductividad (impedancia). Esta tecnología utiliza el principio de que las células son malas conductoras eléctricas. En estos instrumentos la sangre se diluye en un medio eléctricamente

conductor y se la fuerza a pasar a través de un pequeño orificio entre dos electrodos. Las células desplazan una pequeña cantidad de líquido conductor e incrementan la resistencia eléctrica causando un cambio de potencial entre los electrodos, con la consiguiente producción de un pulso, en donde la amplitud es proporcional al tamaño de la célula y la cantidad de impulsos, al número de células.

Los eritrocitos y plaquetas se separan basándose en el tamaño y los leucocitos se determinan tras lisar los eritrocitos con unas gotas de saponina, dejando los núcleos celulares libres (que es lo que realmente se cuenta). Estos analizadores permiten diferenciar dos poblaciones leucocitarias que si bien no facilitan datos fiables en las especies canina y felina respecto al diferencial leucocitario (Pastor *et al.*, 1999a, 1999b), sí lo hacen en el caso de la especie equina (Pastor *et al.*, 1992).

La anchura de distribución del histograma de hematíes (RDW) informa sobre el grado de anisocitosis eritrocitaria presente en la muestra. En veterinaria no se dispone de suficientes datos publicados para facilitar la interpretación de la RDW; sin embargo, sí se ha confirmado éste como un parámetro útil para evaluar anemias por deficiencia en hierro –muy poco frecuente en los équidos–, eritropoyesis activa y, en muestras almacenadas, casos en los cuales se produce un aumento de la anisocitosis (Weiser, 1982; Tvedten, 1993).

El histograma de la concentración de hemoglobina y el ancho de distribución del mismo (HDW) proporcionan información sobre la anisocromía de la muestra. Sin embargo, su utilidad e interpretación en medicina veterinaria debe evaluarse todavía, debido a que sólo son capaces de determinarla los analizadores de rayo láser. A principios de la década de los 80 se desarrolló el

método de recuento denominado análisis cuantitativo del *buffy-coat*. Este sistema se basa en que la diferente densidad de cada grupo de células sanguíneas hace que se coloquen en bandas diferenciadas, cuando la sangre se coloca en un tubo de hematocrito y se somete a centrifugación. La anchura de cada banda refleja el número de células presentes en cada población.

La citometría de flujo es el último avance en la tecnología de analizadores hematológicos. Dentro de ellos, los que utilizan doble ángulo de luz láser son los más novedosos. En este sistema, las células pasan a través de un haz de luz láser que es absorbido y dispersado por la célula. Las interrupciones en el haz de luz se utilizan para determinar el recuento celular, mientras que los cambios en la dispersión de la luz se utilizan para determinar el tamaño celular y su complejidad interna o densidad.

Los modernos analizadores de rayo láser con tinciones de peroxidasa y basofilia permiten realizar el diferencial leucocitario en prácticamente todas las especies domésticas con gran precisión y exactitud (Tvedten y Haines, 1994; Tvedten *et al.*, 2000) (Fig. 8).

Una aportación novedosa y de aplicación práctica importante, en un futuro mediato, es la información que proporcionan estos analizadores de rayo láser sobre la presencia de reticulocitos circulantes. Como se ha mencionado anteriormente, la médula ósea del caballo responde a la pérdida de sangre incrementando la eritropoyesis y produciendo reticulocitos; sin embargo, éstos no son liberados durante la homeostasis o las situaciones de anemia suave o moderada (Jeffcott, 1977; Fernández y Grindem, 2000).

Hasta muy recientemente, la tinción manual, incubando la sangre con un colorante vital (como el nuevo azul de metileno),

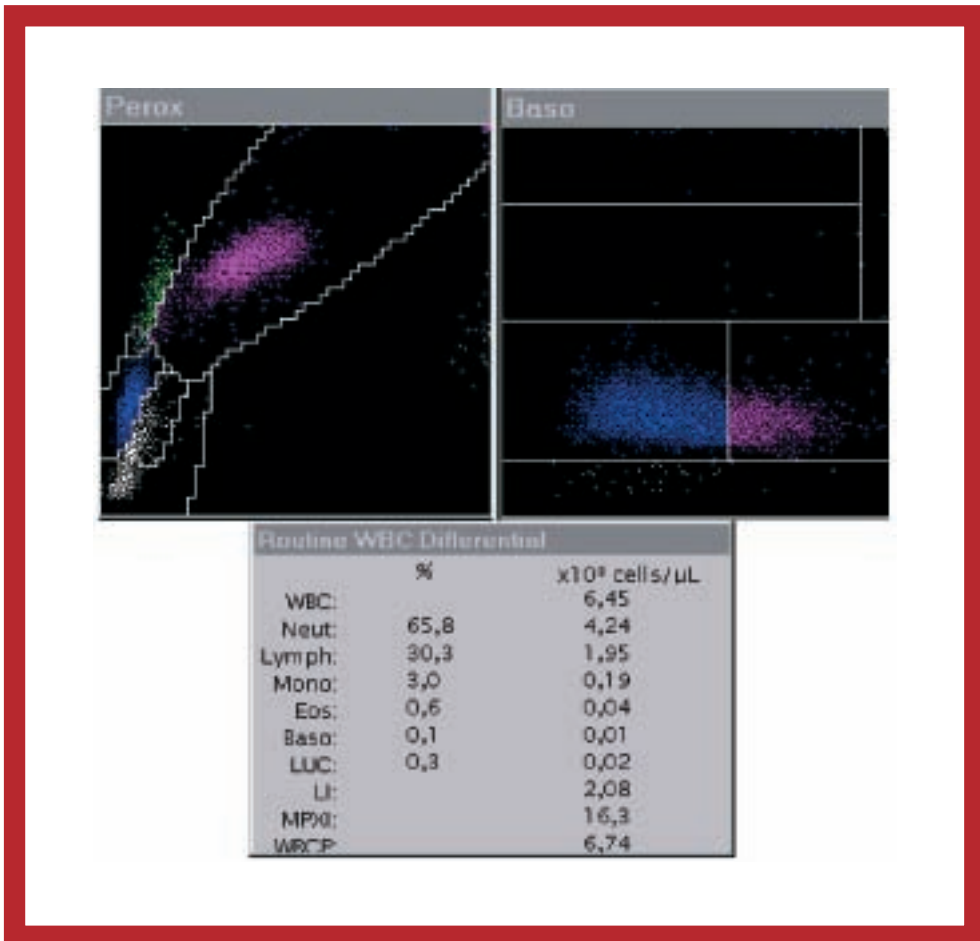
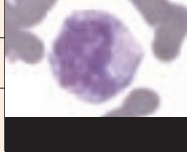


Figura 8. Ejemplo de diferencial leucocitario obtenido con el ADVIA 120 con sangre de caballo.

específico para ácidos nucleicos, y el recuento manual de los eritrocitos que contienen el precipitado de colorante (Deiss y Kurth, 1970; Fernández y Grindem, 2000), no permitían detectar reticulocitos en el caballo, incluso cuando el animal presentaba una anemia grave (Smith y Agar, 1976).

Por tanto, la forma, de comprobar el grado de regeneración eritropoyética en la especie equina se limitaba al análisis del tamaño de los eritrocitos, es decir, de su volumen (VCM) –indicador tardío de regeneración–, de la anchura de distribución de

la serie roja, es decir, del grado de anisocitosis que muestran los eritrocitos (RDW), de los citogramas eritrocitarios o de los histogramas de la distribución del volumen –parámetros todos ellos que aportan los nuevos analizadores hematológicos (Tvedten y Weiss, 2000).

Mediante la observación de biopsias de médula ósea (Lumsden *et al.*, 1975; Easley, 1985; Radin *et al.*, 1986; Malikides *et al.*, 2000) donde se determina la relación mielóide:eritroide (la relación normal es de 0,5:1,5), asumiendo que el comportamiento

mieloide es normal, se puede también valorar el grado de respuesta eritropoyética. Una ratio < a 0,5 supone que hay un incremento en la serie eritroide y, por tanto, una anemia regenerativa. Otra forma de valorar la eritropoyesis en esta especie es contar los reticulocitos mediante preparaciones de médula ósea teñidas con nuevo azul de metileno (Schalm, 1975). Un caballo normal tiene hasta un 3% de reticulocitos en médula ósea y su incremento sugiere un aumento de la eritropoyesis (Lassen y Swardson, 1995; Schalm, 1980; Tablin y Weiss, 1985).

En la actualidad, al aumentar la sensibilidad de los analizadores hematológicos automatizados más actuales, como el ADVIA 120 que cuantifican aquellos eritrocitos que contienen ácidos nucleicos por citometría de flujo, se ha detectado la presencia de reticulocitos en sangre de équidos con anemia grave (Weiss y Moritz, 2003).

Este analizador determina las proporciones de reticulocitos por la combinación de la absorción de la luz y su dispersión en dos

ángulos (el bajo que mide el tamaño de la célula y el alto que mide su cantidad de hemoglobina), mediante la detección de las células que fluorescen, tras incubarlas con un colorante de ácidos nucleicos catiónico, oxazina 750 (Tvedten, 1993; Weiss, 2002), que tiñe las células de acuerdo a su cantidad de ARN. Esto permite que el analizador informe sobre los reticulocitos con baja (reticulocitos maduros), media (reticulocitos de madurez intermedia) y alta absorbancia (reticulocitos inmaduros) (Fig. 9).

Estos métodos automatizados identifican la proporción de células que contienen ácido nucleico en > 40.000 eritrocitos (Cooper *et al.*, 2005), dependiendo de la densidad eritrocitaria de la muestra, en lugar de en 1.000 eritrocitos como sucede en el método manual. Además, la medida directa del tamaño y concentración de hemoglobina de un gran número de reticulocitos, que llevan a cabo estos contadores, permite analizar de forma automatizada la variación de estos parámetros, lo que no era posible realizar

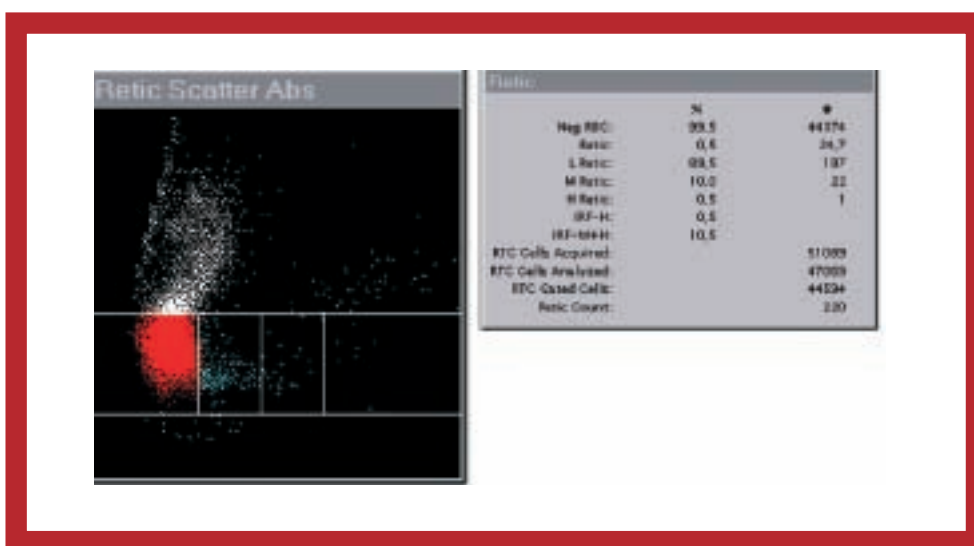
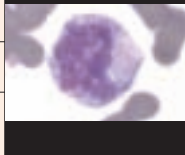


Figura 9. Ejemplo de recuento de reticulocitos. Se identifican varias poblaciones según la cantidad de gránulos. EjeY = densidad celular, EjeX = tamaño celular.



con la determinación manual de reticulocitos y sólo en una medida limitada en los aparatos que utilizan un sistema de funcionamiento de impedancia eléctrica (Knoll, 2000; Waters y Seal, 2001).

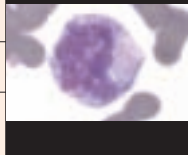
Cooper *et al.* (2005) comprobaron mediante el uso del analizador de citometría de flujo ADVIA 120 que en caballos a los que se les había provocado una anemia grave por sangría, se producía un incremento en los parámetros de reticulocitos estudiados por el aparato, principalmente en el volumen corpuscular medio del reticulocito (MCVr) y en la concentración de hemoglobina reticulocitaria (CHr). En los animales a los que se le impuso un tratamiento con eritropoyetina se comprobó el incremento del número de reticulocitos y la modificación de los parámetros reticulocitarios proporcionados por el analizador (MCVr, CHr, RDWr –anchura de distribución de reticulocitos–, HDWr –anchura de distribución del contenido en hemoglobina de los reticulocitos).

En conclusión, el examen laboratorial de la sangre equina proporciona una información que contribuye a reducir la lista de diagnósticos potenciales o, en menor número de ocasiones, a realizar un diagnóstico específico. La incorporación en los laboratorios de nuevos analizadores hematológicos ha contribuido a mejorar la precisión y exactitud de los parámetros analizados y a abrir nuevas expectativas sobre la utilidad práctica de otros parámetros menos conocidos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Archer RK and Clabby J. (1965). The effect of excitation and exertion on the circulating blood of horses. *Vet Record*, 77: 689-690.
2. Archer RK and Jetcott LB. (1977). *Comparative clinical hematology*. 1st ed. Oxford: Blackwell Scientific, 161.
3. Boyer JD, Breeden DC and Brown DL. (2002). Isolation, identification, and characterization of compounds from *Acer rubrum* capable of oxidizing equine erythrocytes. *Am J Vet Res*, 63 (4): 604-610.
4. Brown CM and Darien BJ (1989). Anemia-pale mucous membranes. In: *Problems in equine medicine*. Brown, C. M. (ed). Lea and Febiger, Philadelphia, 161-168.
5. Carlson G. (2002). Clinical chemistry tests. In: Smith, B. P. (ed.) *Large animal internal medicine*, 3rd ed. St Louis, Mosby, 389-412.
6. Clarke LL, Argenzio RA and Roberts MC (1990). Effect of meal feeding on plasma volume and urinary electrolyte clearance in ponies. *Am J Vet Res*, 51: 571-576.
7. Clarke LL, Ganjam VK, Fichtenbaum, B *et al.*, (1998). Effect of feeding on renin-angiotensin-aldosterone system of the horse. *Am J Physiol*, 254: R524-530.
8. Cooper C, Sears W and Bienzle D (2005). Reticulocyte changes after experimental anemia and erythropoietin treatment of horses. *J Appl Physiol* 99: 915-921.
9. Cuenca R, Pastor J, Viñas L y Lavín S (1993). El hemograma en clínica equina: una ayuda al diagnóstico. *Veterinaria en Praxis*, Vol. 8 n° 2-3, 53-58.
10. Deiss A and Kurth D (1970). Circulating reticulocytes in normal adults as determined by the new methylene blue method. *Am J Clin Pathol* 53: 481 – 484.
11. Duncan JR and Prasse KW (1986). *Veterinary Laboratory Medicine*. Ames, IA, Iowa State University Press.
12. Easley JR (1985). Erythrogram and red cell distribution width of Equidae with experimentally induced anemia. *Am J Vet Res* 46: 2378-2384.
13. Feldman, B. F.; Zinkl, J. G. and Jain, N. C. (2000). *Schalm's veterinary hematology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

14. Fernández FR and Grindem CB Reticulocyte response. (2000). In: Schalm's Veterinary Hematology, edited by Feldman BF, Zinkl JG and Jain NC Philadelphia, PA: Lipincott, p. 110-116.
15. Hinchcliff RW, Kociba GJ and Mitte LA (1993). Diagnosis of EDTA-dependent pseudothrombocytopenia in a horse. *J Am Med Assoc.* 203: 1715-1716.
16. ICSH. (1994). Reference method for the enumeration of erythrocytes and leucocytes. *Clin. Lab. Haemat.* 16, 131-138.
17. Jain NC. (1986). Schalm's Veterinary Hematology, ed4, Philadelphia, Lea and Febiger.
18. Jeffcott LB (1977). Clinical haematology of the horse. In: Archer RK, Jeffcott LB, eds. *Comparative clinical haematology.* Oxford: Blackwell Scie, 161-213.
19. Kerr MG and Snow DH (1982). Alterations in haematocrit, plasma proteins and electrolytes in horses following the feeding of hay. *Vet Record*, 110: 538- 540.
20. Kidd R (1991). The basic components of a leukogram. *Vet. Med.* 86: 263-274.
21. Knoll JS (2000). Clinical automated hematology systems. In: Schalm's Veterinary Hematology, edited by Feldman, B. F., Zinkl, J. G. and Jain, N. C. Philadelphia, PA: Lipincott, p. 3-11.
22. Knottenbelt, D. C.; Holdstock, N. and Madigan, J. E. (2004). *Equine Neonatology Medicine and Surgery.* Edinburg: Saunders.
23. Korbutiak E and Schneiders DH (1994). A confirmed case of equine ehrlichiosis in Great Britain. *Equine Vet Education*, 6: 303-304.
24. Lassen ED and Swardson CJ (1995). Hematology and hemostasis in the horse: normal functions and common abnormalities. *Vet Clin North Am: Equine Pract*, 11 (3): 351-389.
25. Latimer KS and Andreasen CB (2002). Peripheral blood smears. In: Cowell RL and Tyler RD eds. *Diagnostic cytology and hematology of the horse*, 2nd edn. St. Louis, Mosby, 200- 216.
26. Lumsden JH, Valli VE, McSherry BJ, Robinson GA and Claxton MJ (1975). The kinetics of hematopoiesis in the light horse. II. The hematological response to hemorrhagic anemia. *Can J Comp Med* 39: 324-331.
27. Madigan JE and Gribble D (1987). Equine ehrlichiosis in northern California: 49 cases (1968-1981). *J Am Vet Med Assoc* 190: 445.
28. Malikides N, Mollison PJ, Reid SW and Murray M (2000). Haematological responses of repeated large volume blood collection in the horse. *Res Vet Sci* 68: 275 – 278.
29. Pastor J y Cuenca R (2002). Interpretación de los nuevos índices hemáticos. *Argos, Informativo Veterinario*, nº 39, Junio, 26-29.
30. Pastor J, Cuenca R, Viñas L and Lavín S (1992). Differential leucocyte analysis of ten different animal species using a semiautomate haematology instrument Sysmex F-800. *Proceedings of the VIth International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians.* Lyon, France.
31. Pastor J, Cuenca R, Darnaculleta F, Marco I, Viñas L y Lavín S (1999a). Evaluación del analizador hematológico de impedancia eléctrica Baker 9120+ con sangre de caballo. *Medicina Veterinaria* 16:3, 150-161.
32. Pastor J, Cuenca R, Darnaculleta F, Marco I, Viñas L y Lavín S (1999b). Evaluación del analizador hematológico de impedancia eléctrica Baker 9120+ con sangre de caballo. *Medicina Veterinaria* 16:3, 150-161.
33. Prasse KW, George L. and Whitloch RH (1981). Idiopathic hypersegmentation of neutrophils in a horse. *J Am Vet Med Assoc*, 178: 303-305.



34. Radin MJ, Eubank MC and Weiser MG (1986). Electronic measurement of erythrocyte volume and volume heterogeneity in horses during erythrocyte regeneration associated with experimental anemias. *Vet Pathol* 23: 656-660.
35. Rossdale PD, Burguez PN and Cash RSG (1982). Changes in blood neutrophil/lymphocyte ratio related to adrenocortical fuction in the horses. *Equine Vet J* 14: 293.
36. Rowan RM (1999). Globalization and Hematology Standardization. Education Program Supplement, Bangkok, Thailand. Octubre 24-28.
37. Schalm OW (1975). Equine hematology as an aid to diagnosis. *Proc 1st Int Symp Equine Hematology. AAEP*, 3-16.
38. Schalm OW (1980). Equine hematology: Part IV—erythroid marrow cytology in response to anemia. *Equine Pract*, 2 (5): 35 – 40.
39. Smith JE and Agar NS (1976). Studies on erythrocyte metabolism following acute blood loss in the horse. *Equine Vet J*. 8: 34-37.
40. Stewart GA, Clarkson GT and Steel JD (1970). Hematology of the racehorse and factors affecting the interpretation of the blood count. *Proc 16th Ann Conv Am Assoc Equine Pract*, 17-35.
41. Stockham SL, Harvey JW and Kinden DA (1994). Equine glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Vet Pathol* 31: 518.
42. Tablin F and Weiss L (1985). Equine bone marrow: a quantitative analysis of erythroid maturation. *Anat Rec*, 213 (Oct): 202-206.
43. Tvedten H (1993). Advanced hematology analyzers: interpretation of results. *Vet Clin Pathol* 22: 72-80.
44. Tvedten H and Haines C (1994). Canine automated differential leukocyte count: study using a hematology analyzer system. *Vet. Clin. Pathol.* 23 (3): 90-96.
45. Tvedten H and Weiss DJ (2000). Classification and laboratory evaluation of anemia. In: Feldman BE, Sinkl JG and Jain NC, eds. *Schalm's veterinary hematology*. 5th edn. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 143-150.
46. Tvedten H, Scott M and Boon GD (2000). Interpretation of cytograms and histograms of erythrocytes, leukocytes and platelets. In: Bonagura JD (ed). *Kirk's Current Veterinary Therapy XIII Small Animal Practice*. W. B. Saunders, Co, Philadelphia 381-390.
47. Tyler RD, Cowell RL, Clinkenbeard EM *et al.*, (1987). Hematologic values in horses and interpretation of hematologic data. *Vet Clin North Am Equine Pract* 3: 461.
48. Waters HM and Seal LH (2001). A systematic approach to the assessment of erythropoiesis. *Clin Lab Haematol* 23: 271- 283.
49. Weiss DJ (2002). Application of flow cytometric techniques to veterinary clinical hematology. *Vet Clin Pathol* 31: 72-82.
50. Weiss DJ and Moritz A (2003). Equine immune-mediated hemolytic anemia associated with *Clostridium perfringens* infection. *Vet Clin Pathol* 32: 22-26.
51. Weiss DJ, Geor RJ and Clark MS (1994). Effects of echinocytes on hemorrhheologic values and exercise performance in horses. *Am J Vet Res*, 55: 204-210.
52. Weisser MG (1982). Erythrocyte volumen distribution analysis in healthy dogs, cats, horses and dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 43: 163-166.
53. Weisser MG, Kohn C and Vachon A (1983). Erythrocyte volume distribution analysis and hematological changes in two horses with immune-mediated hemolytic anemia. *Vet Pathol*, 20: 424-433.