

Análisis automático de reticulocitos

Dr. Juan Carlos Otaso



ACTUALIZACION EN
EL LABORATORIO
HEMATOLOGICO

Hospital Italiano de Buenos Aires

HEMATOLOGIA, Vol. 3 N° 3: 288-290
Noviembre-Diciembre, 1999

INTRODUCCIÓN

El análisis automático de reticulocitos está al alcance de los laboratorios hematológicos desde comienzos de 1990 y será probablemente " el método de los hospitales de mediana a gran complejidad en la próxima centuria."

RESUMEN

El contaje automático de reticulocitos posee:

- 1) Mejor precisión de contaje lo cual optimiza su utilidad clínica.
- 2) Los métodos automáticos permiten determinar el nivel de ARN en forma semicuantitativa y el cálculo por derivación de un índice RMI o índice de maduración reticulocitaria y el índice de ARN.

Estos índices tienen utilidad clínica en:

- A) Monitoreo de regeneración después del trasplante de médula ósea o quimioterapia.
- B) Determinación de stem-cell después de terapia de factores de crecimiento o drogas citóticas.
- C) Monitoreo de transfusiones en neonatos y pronósticos de anemia de enfermos con HIV+ y prematuridad.
- D) Monitoreo de terapia con eritropoyetina en fallo renal, SIDA, mielodisplasia y donantes de sangre.
- E) Monitoreo de trasplante renal en la producción de eritropoyetina.
- F) Evaluación de anemias normocrómicas de varias etiologías.
- G) Clasificación de anemias.
- H) Anemia aplásica.

- I) Monitoreo en la eficacia de anemias con déficit Fe, B12 y folatos.
- J) Monitoreo de drogas citóticas en médula ósea como AZT.
- K) Determinación de crisis aplásicas en anemias hemolíticas.
- L) Determinación de hemorragias o hemólisis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utiliza sangre recolectada en EDTA tripotásico (1.5 a 2.2 mg/ml).

La determinación deberá realizarse después de la recolección de la muestra de sangre o dentro de las 6 horas de la extracción. En caso contrario conservar entre 2 a 6 grados centígrados hasta 48 horas.

Las muestras se prepararán de acuerdo a los métodos recomendados por el fabricante del instrumento.

RESULTADOS

Durante los períodos de demanda eritropoyética, que se acompañan del incremento de niveles de eritropoyetina, la vida media de los reticulocitos en la sangre se incrementa de 3 a más días a causa de la diferencia acelerada eritrocitaria y de la liberación temprana de eritrocitos de la médula ósea.

La gradual pérdida de ARN durante la madurez reticulocitaria, produce cambios bioquímicos en estas células, con cambios paralelos en varias enzimas como G6PH, pérdida del receptor de la expresión de transferrina, cambios en los niveles de colesterol y lípidos en la membrana y declinación de otros niveles de proteínas.^{1,6,7,8}

Una fracción inmadura puede ser identificada en base a la expresión de CD71 o receptor de transferrina.

La aplicación clínica del contenido de reticulocitos en paralelo con la medición del receptor de transferrina es impracticable y de alto costo.

Los laboratorios pueden tener varios métodos para medir IRF. Los métodos automáticos usan fluorescencia y evaluación de ácidos nucleicos (ARN y ADN)³. Estos han mostrado un mejoramiento en la precisión sobre el método manual, se observa un coeficiente de variación del 15% en estudios intra-laboratorio e inter-institucionales y en tests de proficiencia como el del College of American Pathologist (CAP) National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS) y International Committee for Standardization in Hematology (ICSH).

Existen varios equipos que proveen la medición de IRF que usan Thiazole Orange (TO): Sysmex R y el CELL DYN 4000.

Otros métodos automáticos que usan dispersión de la luz para reconocer reticulocitos son: STKS/MAXM, CELL DYN 3500 y Technicon H3. La precisión de conteo de todos ellos es excelente pero la performance del CELL DYN 4000 y el Sysmex R demuestra mayor precisión.

Para un seguro IRF los instrumentos usan el método TO necesario para destacar plaquetas gigantes, cuerpos de Howell Jolly y células nucleadas.

El Sysmex R tiene la capacidad de dividir las regiones de reticulocitos entre zona baja (LFR), zona media (MFR) y zona alta (HFR) permitiendo varios algoritmos.

Davis, Houmen y Col. se basan para el cálculo del IRF en las regiones MFR y HFR⁷. Otros utilizan la región HFR para evaluar distintos cambios de la actividad eritropoyética. Aunque una revisión publica datos que no favorecen el uso de HFR, se propone la combinación de los valores de MFR Y HFR. El uso de HFR solamente debido a su rango de referencia: 0,00-0,04, permite la determinación de condiciones hipoplásicas o aplásticas. Por el contrario los valores de MFR y HFR con un rango de referencia: 0,05-0,22, permiten la determinación de los valores subnormales o disminuidos.

Independientemente de la metodología o rango de referencia, todos los métodos para cuantificar el IRF tiene en común la expresión de ARN como fracción.

Las determinaciones de IRF en el trasplante de médula ósea en un período temprano (día 5-20) indica, con éxito, el precoz engraftment que cualquier otro parámetro del laboratorio.⁵

El Technicon H3 reporta una variedad de índices: Volumen celular reticulocitario (MCVr), concentración de hemoglobina reticulocitario (CHCMr), contenido de hemoglobina celular reticulocitaria (CHR)

distribución de poblaciones con índices como RDWr, HDWr Y CHDWr.

Un estudio reciente que analiza el contenido de hemoglobina reticulocitaria predice la deficiencia de Fe en pacientes con hemodiálisis recibiendo eritropoyetina recombinante, con una sensibilidad de 78% y una especificidad de 71%.^{9, 10, 11}. En comparación, teniendo en cuenta los valores de saturación de transferrina por debajo del 20%, el CHR presentó 50% de sensibilidad y 60% de especificidad y la ferritina sérica presentó 50% de sensibilidad y 39% de especificidad.

En el siguiente cuadro se observan la relación entre el IRF y el conteo de reticulocitos en distintas patologías^{10,11,12,13,14,15}

	conteo de reticulocitos	IRF
Anemia aplástica	↓	↓
Crisis aplástica	↓	↓ / N
Anemia hipoplásica	↓	N / ↑
Regeneración medular	↓	N / ↑
Desordenes crónicos	↓ / N	N
Deficiencia de Fe	↓ / N	↑
Talasemia	N / ↑	N / ↑
Mielodisplasia	ED	N / ↑
Deficiencia de B12 y folato	↓ / N	↑
Anemia hemolítica	↑	↑
Pérdida de sangre	N / ↑	↑

N Normal ↑ aumentado ↓ disminuido

ED En discusión

DISCUSIÓN

La automatización de la cuantificación de los reticulocitos podría tener un uso clínico mayor, particularmente si lo profesionales de los laboratorios informan a los médicos los beneficios de esta tecnología, sobre todo, en cuanto a precisión y exactitud. La imprecisión asociada con la técnicas manuales microscópicas se han corregido con los métodos automáticos.

Los parámetros IRF y CHR, necesitan seguir siendo investigados para definir completamente su utilidad clínica. Como también se debería trabajar en estandarizar el IRF.

La tecnología probablemente continuará evolucionando tendiendo a una completa integración de los análisis de reticulocitos en analizadores hematológicos, de manera que el conteo manual sea reemplazado en la rutina diaria como ha ocurrido con los conteos plaquetarios.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tsuda I, Tatsumi N: Maturity of Reticulocytes in various hematological disorders. *Eur J. Haematol*, 1989; 43: 252.
2. Wells Da, Daigneault - Greech Da, Simrell Cr: Effect of iron status on reticulocyte mean channel fluorescence. *Am J Clin Path* 1992; 97: 130.
3. Davis BH, OrnoID K, Bigelow NC: Flow cytometric reticulocyte maturity index (RMI): A useful laboratory parameter of erythropoietic activity in anemia. *Cytometry* 1994; 14: 318.
4. Musto P, Modoni S, Alicino G, Savino A, Longo A, Bodenizza C, Falcone A, D'Arena G, Scalzulli P, Perla G: Modifications of erythropoiesis in myelodysplastic syndromes treated with recombinant erythropoietin as evaluated by soluble transferrin receptor, high fluorescence reticulocytes and hypochromic erythrocytes. *Haematologica*. 1994; 79: 493.
5. Lesesve JF, Lacombe F, Marit G, Bernard P, Belloc F, Reiffers J: High fluorescence reticulocytes are an indicator of bone marrow recovery after chemotherapy. *Eur J. Haemato* 1995; 54: 61.
6. Cavill I: The rejected reticulocytes *Br. J. Haemato*. 1993; 84: 563.
7. Davis B, Flow cytometric analysis of red cells. In: K Bauer, R Duque, T Shankey (eds) *Clinical Flow Cytometry. Principles and Applications*. Baltimore, Williams and Wilkins 1993; p 373.
8. Tanke HJ: Reticulocytes and mature erythrocytes. In: OD laerum, R Bjerknes (eds) *Flow Cytometry in hematology, Analytical Cytology*. San Diego, **Academic Press**. 1992; p 75.
9. Brugnara C, Chambers LA, Malynn E, y Col. Red blood cell regeneration induced by subcutaneous erythropoietin Iron-deficient erythropoiesis in iron-replete subjects. *Blood*. 1993; 81: 956.
10. Magnani M, Rossi L, Bianchi y Col. Dose-dependent effects of recombinant human erythropoietin on the reticulocyte population of rabbits. *Arzneimittelforschung*. 1992; 42: 1266.
11. Moulin B, Ollier J, George f. Y Col. Serum erythropoietin and reticulocyte maturity index after renal transplantation: A prospective longitudinal study. *Nephron*. 1995; 69: 259.
12. Serre Af, Souweine B, Evreux O y Col. Reticulocyte response to endogenous erythropoietin after renal transplantation. *Clin transplant*. 1994; 8: 353.
13. Davies S, Cavill I, Bentley N, y col: Evaluation of erythropoiesis after bone marrow transplantation: Quantitative reticulocyte counting *Br. J. Haematol*. 1992; 81: 12.
14. MacDougall Ic, Cavill I, hulme B, y Col. Detection of functional iron deficiency during erythropoietin treatment: A new approach. *Br Med J*, 1992; 304: 225.
15. Kendall Rg Jeffries R, Cavvill I y col. Relationship between endogenous erythropoietin levels, reticulocyte count, and reticulocyte RNA distribution. A study of anemic patients with and without renal failure. *Ann NY Acad Sci*. 1194; 718: 353.