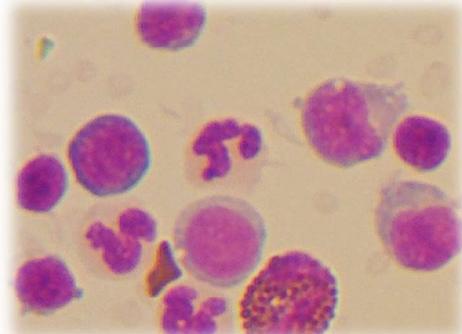




UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE VETERINARIA



***VALIDACIÓN DEL ANALIZADOR HEMATOLÓGICO
LASERCYTE EN BURROS SANOS***



TESIS DOCTORAL

Carlos Antonio González De Cara

-Córdoba 2017-

TITULO: *VALIDACIÓN DEL ANALIZADOR HEMATOLÓGICO LASERCYTE EN
BURROS SANOS*

AUTOR: *Carlos Antonio González De Cara*

© Edita: UCOPress. 2017
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



**DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**



***VALIDACIÓN DEL ANALIZADOR HEMATOLÓGICO
LASERCYTE EN BURROS SANOS***

**Carlos Antonio González De Cara
Córdoba, 2017**



DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



***VALIDACIÓN DEL ANALIZADOR HEMATOLÓGICO
LASERCYTE EN BURROS SANOS***

Memoria de tesis presentada por D. Carlos Antonio González De Cara,
Licenciado en Veterinaria por la Universidad de Córdoba, para optar al grado
de DOCTOR

Los directores:

Dr. Alejandro Pérez Écija

Dr. Francisco J Mendoza García

**D. ALEJANDRO PÉREZ ÉCIJA, DOCTOR EN VETERINARIA POR
LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA, PROFESOR CONTRATADO
DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA
ANIMAL DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA,**

INFORMA:

Que D. Carlos Antonio González De Cara ha realizado bajo mi dirección, en el Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad de Córdoba, el trabajo titulado: “*Validación del analizador hematológico Lasercyte en burros sanos*”, y que a mi criterio dicho trabajo reúne los méritos suficientes para optar al Grado de Doctor en Veterinaria.

Y para que así conste, firma el presente informe en Córdoba, a 13 de marzo de dos mil diecisiete.

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized, overlapping letters that appear to be 'A', 'E', and 'C'.

D. FRANCISCO JAVIER MENDOZA GARCÍA, DOCTOR EN VETERINARIA POR LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA,

INFORMA:

Que D. Carlos Antonio González De Cara ha realizado bajo mi dirección, en el Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad de Córdoba, el trabajo titulado: *“Validación del analizador hematológico Lasercyte en burros sanos”*, y que a mi criterio dicho trabajo reúne los méritos suficientes para optar al Grado de Doctor en Veterinaria.

Y para que así conste, firma el presente informe en Córdoba, a 1 de marzo de dos mil diecisiete.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and strokes, positioned centrally below the text.

“La imaginación es más importante que el conocimiento”

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

Con estas líneas me gustaría agradecer a todas las personas que han ayudado a que esta Tesis saliera adelante y que, de una manera u otra, han estado a mi lado a lo largo de estos años.

En primer lugar agradecer a mis Directores de Tesis, el Prof. Alejandro Pérez Écija y el Prof. Javier Mendoza por su dedicación y paciencia conmigo, por haberme transmitido la ilusión y la pasión por la investigación, sin ellos este trabajo habría sido imposible.

Gracias al Prof. Mariano Herrera, mi maestro y mi amigo, gracias por haber confiado en mí desde que entré en la Facultad, gracias por haberme dado un sin fin de oportunidades para mi desarrollo profesional y personal, gracias por haber sido y ser mi maestro.

A mi compañero, amigo y hermano Raúl, por aguantarme en los días buenos y sobre todo en los días malos en los que mi sangre “granaina” aflora... a Cristina, por enseñarme el valor de una amistad, por cuidar de mis pequeños como si fueran suyos y por darme una sonrisa siempre que lo he necesitado. A Marta y Luis por estar siempre ahí presentes, apoyándome en mis íres y devenires.

Agradecer por supuesto a mi familia, sin los que no podría haber hecho nada de lo que he hecho. En especial a los que no están y tanto echo de menos; a mi Padre por haberme dado su cabezonería, por enseñarme la honestidad y buen hacer de las cosas, por apoyarme siempre y darme la confianza con la que salir siempre con la cabeza por delante. A mi abuela María, por su amor y paciencia, por esas tardes de historias y por creer en Saeta cuando nadie lo hacía. A mi tío Valero, que me enseñó a apreciar el trabajo con los animales y junto a mi tío Antonio me hicieron cambiar el miedo a dedicación y pasión por los caballos.

A mi madre, Encarna, porque los que la conocen saben de lo que hablo, de una chispa vital que te incita al movimiento y no te deja parar ni un solo segundo, gracias por no dejarme caer... y por recogerme cuando lo he hecho..., gracias por tus consejos y tu apoyo incondicional. Y por supuesto, a mis hermanos y sobrinos, por ser fuente de motivación y apoyo en todo momento.

Finalmente y no menos importante, a ti Almudena por tu cariño y comprensión, por aguantarme y apoyarme, sobre todo estos últimos meses.

ÍNDICE

I. RESUMEN	15
II. ABSTRACT	17
III. INTRODUCCIÓN	21
IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	27
Capítulo 1. Principios de hematología veterinaria.	29
• 1.1. Eritrocitos.	29
• 1.2. Leucocitos.	43
• 1.3. Plaquetas.	54
Capítulo 2. Técnicas de análisis hematológico.	59
• 2.1. Examen macroscópico de la muestra.	61
• 2.2. Determinación del hematocrito mediante centrifugación.	62
• 2.3. Examen citológico del frotis sanguíneo.	64
• 2.4. Contajes celulares manuales.	74
• 2.5. Fórmula diferencial leucocitaria.	76
• 2.6. Determinación de la hemoglobina.	79
• 2.7. Examen de médula ósea.	80
• 2.8. Analizadores automáticos.	80
• 2.9. Validación y estandarización de técnicas y equipos laboratoriales.	98
• 2.10. Comparación de técnicas y equipos laboratoriales.	112
• 2.11. Estudios comparativos del rendimiento de equipos hematológicos en veterinaria.	120
Capítulo 3. Diferencias entre burros y caballos.	130
• 3.1. Diferencias genéticas.	131
• 3.2. Diferencias morfológicas y anatómicas.	132
• 3.3. Diferencias fisiológicas.	133
• 3.4. Diferencias farmacológicas y terapéuticas.	137
V. AIMS	141
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	145
<i>1. Selección de los animales.</i>	<i>147</i>
<i>2. Toma de muestras.</i>	<i>152</i>
<i>3. Procesamiento de las muestras.</i>	<i>153</i>
<i>4. Estudio hematológico manual.</i>	<i>154</i>
<i>5. Estudio hematológico mediante analizador de impedancia.</i>	<i>163</i>
<i>6. Estudio hematológico mediante LaserCyte.</i>	<i>165</i>
<i>7. Validación del sistema LaserCyte en muestras de burros.</i>	<i>166</i>
<i>8. Estudio morfométrico de leucocitos asnales.</i>	<i>176</i>
<i>9. Análisis estadístico.</i>	<i>178</i>
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	181
<i>1. Selección de los Animales.</i>	<i>183</i>
<i>2. Estudio Hematológico Manual.</i>	<i>186</i>
<i>3. Estudio Hematológico mediante analizador de impedancia.</i>	<i>197</i>
<i>4. Estudio hematológico mediante LaserCyte.</i>	<i>203</i>

<i>5. Validación del sistema LaserCyte en muestras de burros.</i>	<i>210</i>
<i>6. Estudio morfométrico de leucocitos asnales.</i>	<i>247</i>
VIII. CONCLUSIONS	253
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	257

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

<i>μl</i>	Microlitro
<i>μm</i>	Micrómetro
<i>AEFA</i>	Asociación Española de Farmacéuticos
<i>AINEs</i>	Antiinflamatorios no esteroideos
<i>Bas</i>	Basófilo
<i>BCS</i>	Body condition score
<i>BFU-Es</i>	Burst forming unit-erythroid
<i>Cel</i>	Célula
<i>CFU-E</i>	Colony forming unit-erythroid
<i>CID</i>	Coagulación intravascular diseminada
<i>CLIA</i>	Clinical Laboratory Improvements Amendments guidelines
<i>CLSI</i>	Clinical Laboratory Standards Institute
<i>CV</i>	Coeficiente de variación
<i>DE</i>	Desviación estándar de la media
<i>dL</i>	Decilitro
<i>EDTA</i>	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>Eos</i>	Eosinófilo
<i>ET</i>	Error total
<i>fL</i>	Femtolitro
<i>Gr</i>	Gramos
<i>Hb</i>	Hemoglobina
<i>HCT</i>	Hematocrito
<i>IFCC</i>	International Federation of Clinical Chemists
<i>IM</i>	Intramuscular
<i>IV</i>	Intravenoso
<i>Kg</i>	Kilogramos
<i>LAE o ALE</i>	Límites de error aceptables de Tonks

<i>L</i>	Litro
<i>Lym</i>	Linfocitos
<i>MCH</i>	Mean corpuscular hemoglobin
<i>MCHC</i>	Mean corpuscular hemoglobin concentration
<i>MCV</i>	Mean corpuscular volume
<i>mg</i>	Miligramos
<i>mm²</i>	Milímetros cuadrados
<i>Mono</i>	Monocitos
<i>MPC</i>	Mean platelet component
<i>MPV</i>	Mean platelet volume
<i>Neu</i>	Neutrófilo
<i>nm</i>	Nanómetro
<i>OIE</i>	Organización Mundial de Sanidad Animal
<i>PCDW</i>	Platelet component distribution width.
<i>PCT</i>	Plaquetocrito
<i>PCV</i>	Packed cell volume
<i>PDW</i>	Platelet distribution width
<i>Pg</i>	Picogramos
<i>Plt</i>	Plaquetas
<i>PO</i>	Posología oral
<i>QGI</i>	Quality goal index
<i>RAIA</i>	Registro Andaluz de Identificación Animal
<i>RBC</i>	Red blood cell count
<i>RDW</i>	Red blood cell distribution width
<i>SC</i>	Subcutáneo
<i>SEHH</i>	Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia
<i>SEQC</i>	Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular

<i>TE_{max} o TE_a</i>	Error total admisible
<i>TE_c</i>	Error total calculado
<i>UI</i>	Unidad internacional
<i>VCM</i>	Volumen eritrocitario medio
<i>VLDLs</i>	Very low density lipoproteins
<i>WBC</i>	White blood cell count

I. RESUMEN

Los burros tienen un papel central en la economía de países en desarrollo, siendo utilizados como medio de transporte, animales de carga y en labores agrarias. Más recientemente, esta especie también está siendo utilizada como mascota, así como en actividades de asinoterapia o para producción de leche. Debido a la escasa investigación en medicina asnal, muchos clínicos extrapolan rangos de referencia y datos publicados para caballos en burros. Este acercamiento se ha demostrado marcadamente erróneo, pudiendo conllevar graves errores diagnósticos, tratamientos inadecuados o innecesarios, así como aumentando un gasto injustificado para el dueño.

El análisis hematológico es una de las bases del examen clínico inicial en cualquier paciente veterinario, siendo esencial establecer rangos de referencia especie-específicos y adaptados a la edad, sexo, raza, localización geográfica y equipamiento utilizado para dicha evaluación hematológica. Los analizadores automáticos hematológicos con tecnología láser son uno de los últimos avances en medicina veterinaria, permitiendo una mayor rapidez y fiabilidad en los parámetros obtenidos que los equipos basados en impedancia o las técnicas de estudio hematológico manual. Los objetivos de esta tesis doctoral fueron estudiar los resultados hematológicos en una amplia población de burros de Andalucía, determinar el nivel de acuerdo entre técnicas para esta especie y validar los resultados obtenidos con el equipo LaserCyte (analizador de tipo láser) en burros.

Para desarrollar este trabajo, se obtuvo sangre de una población de 84 burros residentes en varias explotaciones de Andalucía y la misma se estudió mediante técnicas manuales, con un analizador automático de impedancia (Sysmex F820) y con el analizador LaserCyte. También se evaluó el nivel de precisión, exactitud, el error total presente en los resultados, la linealidad y otros parámetros de validación y estandarización para sangre de burro en el equipo LaserCyte. De igual forma, se comparó el grado de acuerdo entre técnicas para determinar si los resultados pudieran ser extrapolables entre sí. Por último, y ante la sospecha de marcadas diferencias en el tamaño leucocitario entre asnos y caballos que pudiesen provocar errores en el algoritmo de clasificación leucocitario de LaserCyte, se realizó un estudio morfométrico del tamaño de las distintas subpoblaciones leucocitarias en asnos.

Los resultados obtenidos estuvieron dentro de los rangos hematológicos previamente reportados para esta especie, independientemente de la técnica utilizada. Se

observaron diferencias significativas a nivel hematológico entre burros atendiendo al sexo (mayor número de eritrocitos circulantes pero menor hemoglobina y volumen corpuscular medio en machos respecto a hembras) y la edad (tendencia a menores contajes eritrocitarios y leucocitarios, hematocrito y hemoglobina en animales de edad avanzada respecto a jóvenes), las cuales coincidieron con las previamente observadas en esta especie por varios autores. El nivel de acuerdo entre técnicas hematológicas fue, en general, pobre, apareciendo las mayores divergencias en los contajes diferenciales leucocitarios. LaserCyte mostró un rendimiento adecuado para la mayoría de parámetros, a excepción de dichos contajes diferenciales, lo cual muy probablemente estaría relacionado con la ausencia de un algoritmo especie-específico de clasificación leucocitaria en este analizador. Esta teoría también estaría respaldada por los resultados del estudio morfométrico, que mostraron marcadas diferencias en la distribución de los tamaños leucocitarios entre asnos y caballos, en especial respecto al solapamiento entre poblaciones.

II. ABSTRACT

Donkeys have traditionally played a central role in developing countries, being used as draft animals. In developed countries, donkeys are an emerging pet animal and new uses, such as onotherapy or milk production, are rapidly growing. Since research in donkeys is scarce, many clinicians extrapolate data and reference ranges from horses. This approach could cause misdiagnoses, unnecessary or inadequate treatments and over cost to the owner.

Hematology is a basic tool in veterinary internal medicine. Species-specific intervals are crucial for a proper hematological analysis. Furthermore, differences have been reported in several parameters attending to gender, age, breed and even geographical location. Laser-based hematology analyzers are in general more accurate and cost-effective compared to manual techniques and impedance analyzers. This work aims to evaluate hematological data from a donkey population from Andalusia, determine the agreement between techniques in this species and validate the LaserCyte analyzer in donkeys.

Samples were obtained from 84 donkeys from several farms in Andalusia and agreement between the results from LaserCyte, Sysmex F820 and manual methods was obtained. Accuracy, precision, total error, linearity and other validation indexes for LaserCyte were calculated in those samples. A morphometric study on donkeys' leukocytes size was carried out in order to determine any misclassification of white blood cells using equine software.

Our results were within reported intervals for this species according to previous studies. Significant differences were observed attending to gender (males showing higher red blood cell counts and lower hemoglobin concentration and mean corpuscular volume) and age (lower blood and white cell counts, hematocrit and hemoglobin concentration were observed in older donkeys compared to younger ones). Those differences were in accordance to previous reports in donkeys by other authors. Agreement between techniques was poor, mostly due to incongruities in the differential leukocyte count. LaserCyte showed a reasonable performance in donkey blood, except for those differentials. This finding could be explained by the use of an equine software and misclassifications of leukocytes due to differences in size or granularity between cells in

these species. Indeed, donkeys' leukocytes size showed marked overlapping and several differences with horses in the morphometric study.

III. INTRODUCCIÓN

La hematología es la parte de la fisiología encargada del estudio de la sangre, tanto en animales y humanos sanos como en la enfermedad (hemopatología). La sangre es uno de los tejidos más dinámicos e importantes a nivel orgánico, siendo la encargada del reparto de nutrientes y oxígeno a todas las poblaciones celulares del organismo, así como de la recogida de los detritus y desechos metabólicos de las mismas. De igual forma, la sangre desarrolla una función primordial en el mantenimiento de la homeostasis orgánica, manteniendo el equilibrio hidroelectrolítico y ácido-base en todo el cuerpo y transportando enzimas, citoquinas y hormonas tanto endocrinas como paracrinas. Por último, la sangre también desarrolla un rol principal en la defensa orgánica, siendo el medio de transporte de las células con acción inmunógena y protagonista principal en el desencadenamiento de la respuesta inflamatoria.

La evaluación cuidadosa y detallada de la sangre es en muchas ocasiones uno de los primeros eslabones para el diagnóstico tanto en pacientes humanos como en veterinaria. La hematología es una de las ramas originarias de la patología clínica y del análisis laboratorial, siendo junto con la bioquímica clínica la base de la evaluación laboratorial de los pacientes. En veterinaria, dada la amplia diversidad de especies objetivo de la misma, es de suma importancia considerar las características especie-específicas de cada parámetro hemático, existiendo en numerosas ocasiones marcadas idiosincrasias que impiden la extrapolación de datos entre las mismas. De igual forma, también hay numerosas variaciones en los parámetros hemáticos dependientes de distintos factores (sexo, edad, raza, localización geográfica, actitud deportiva, etc., etc.) que pueden condicionar las determinaciones hematológicas y que siempre habrían de tenerse en consideración antes de realizar un juicio de los resultados hematológicos.

Los burros (*Equus africanus asinus*; orden Perissodactyla, familia Equidae) son descendientes directos del asno africano salvaje (*Equus africanus*), y están filogenéticamente muy relacionados tanto con el caballo (*Equus caballus*), como con otros équidos como los caballos de Przewalski (*Equus ferus przewalskii*), el kiang (*Equus kiang*), el onagro (*Equus hemionus*), y las cebras (*Equus zebra*). Existen casi 200 razas distintas de asnos clasificadas en la lista de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (<http://dad.fao.org/>).

Los asnos tienen una historia paralela e intrínsecamente entrelazada con los humanos desde hace milenios. Fue uno de los animales más tempranamente domesticados, incluso antes que el caballo. El burro ha contribuido a la expansión geográfica humana y ha influido en la cultura, economía y evolución social de la humanidad. A pesar de su amplio marchamo como especie ligada al ser humano, los asnos han sido tradicionalmente considerados como bestias de escaso valor y han recibido un trato menos favorable que sus familiares cercanos, los caballos (Svendsen, 1991). Su comportamiento calmado (Taylor y Matthews, 1998), su carácter estoico, su capacidad para sobrevivir a base de dietas de escasa calidad y para adaptarse a ambiente climáticos extremos, han hecho de esta especie una de las favoritas para el trabajo agropecuario en países con un importante componente agropecuario (Rossel *et al.*, 2008).

Los burros están distribuidos por todo el mundo, siendo muy comunes en países en vías de desarrollo y también en ciertas áreas con gran tradición ancestral para esta especie (como el arco mediterráneo). No obstante, la población asnal a nivel mundial está reduciéndose, habiéndose observado una caída del 5,7% en la primera década del siglo XXI, la cual podría en parte deberse a factores como el cambio climático, los avances en la mecanización del mundo agrícola y los cambios poblacionales del ambiente rural hacia entornos urbanos. El peligro que supondría la pérdida de la biodiversidad genética y fenotípica de esta especie ha hecho que diversos gobiernos regionales, nacionales e instituciones internacionales hayan comenzado a tomar medidas en pos de su preservación (Aranguren *et al.*, 2002). En el caso de España, el Catálogo Oficial de Razas de Ganado cuenta actualmente con seis razas asnales (Andaluza, Balear, Catalana, Majorera, Zamorano-Leonés y Asno de las Encartaciones), todas ellas catalogadas como razas autóctonas españolas en peligro de extinción (BOE 23/2009, RD 2129/2008, 26 de diciembre).

Respecto a la utilidad de estos animales, los burros continúan a día de hoy siendo una fuente alimentaria (carne, leche) en muchas regiones del mundo, además de ser utilizados en producción de determinados cosméticos, actividades de ocio y turismo activo, mascotas y más recientemente como herramienta terapéutica dirigida a personas con discapacidades mentales o físicas. La leche de la asna es baja en proteínas y grasa, pero rica en lactosa, presentando una composición muy similar a la humana que la hace idónea para su uso como lactoreemplazante en niños con desórdenes alérgicos (Lionetti

et al., 2012). Respecto a la asinoterapia u onoterapia, su uso se ha extendido como terapia de soporte y tratamiento para pacientes con Alzheimer, autismo, desórdenes de atención, síndrome de Down, así como en pacientes geriátricos como modo de aumentar y promover su actividad física, salud mental y calidad de vida. Existen evidencias de que el contacto con los asnos puede aumentar la integración social en estos pacientes, así como su rendimiento físico y psicológico (Borioni *et al.*, 2012).

A pesar del eminente interés que presenta esta especie para la medicina veterinaria y el marcado incremento en la atención a la misma por parte de muy diversos estamentos de la sociedad, existe un llamativo déficit a nivel de investigación científica aplicada al asno. En múltiples ocasiones, cuando el veterinario se enfrenta al diagnóstico y tratamiento de uno de estos animales, existe una tendencia inherente a extrapolar lo publicado y estudiado en el caballo. No obstante, la distancia filogenética entre ambas especies es muy similar a la presente entre caballos y cebras (ambos ejemplos de distintos subgéneros dentro del mismo género). La extrapolación de datos, rangos de referencia, tratamientos y protocolos del caballo al asno podría y puede implicar significantes fallos que conlleven a un diagnóstico erróneo, tratamientos inadecuados o innecesarios y un consecuente incremento no justificado en el gasto del dueño.

Teniendo en consideración todo lo expuesto con anterioridad, en el presente trabajo nos centraremos en la validación y estandarización de parámetros hematológicos en asnos de Andalucía, con especial énfasis en las oportunidades que las nuevas tecnologías de análisis automático por citometría tipo láser ofrecen en esta especie. Para ello se comenzará con la exposición de una minuciosa revisión bibliográfica, en la cual se abordarán en primer lugar las características fisiológicas y factores de variabilidad de las principales poblaciones hemáticas en medicina veterinaria, con especial hincapié en equinos; a continuación se realizará una revisión de las distintas metodologías que en la actualidad permiten el estudio hematológico en especies de interés veterinario y, por último, se acometerá una profunda revisión de las principales diferencias fisiológicas descritas a día de hoy entre caballos y burros.

IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO 1. PRINCIPIOS DE HEMATOLOGÍA VETERINARIA.

La sangre está compuesta por células (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) circulando en un fluido denominado plasma y supone un porcentaje variable del total del peso corporal, calculándose en caballos entre 7 y 11%, dependiendo de la raza (Jain *et al.*, 1986).

El plasma consiste principalmente en agua con un contenido de proteínas de entre 6 y 8 g/dL y 1,5-2 g/dL de sales inorgánicas, lípidos, carbohidratos, hormonas y vitaminas (Burkhard *et al.*, 2010) El plasma se obtiene en el laboratorio mediante centrifugación de la muestra sanguínea y separación de los elementos formes en tubos con anticoagulante. Si la sangre se recolecta en tubos sin anticoagulante (o en tubos con aceleradores de la coagulación) y se permite la formación del coágulo, el fluido obtenido se denomina suero. La concentración de proteínas de este suero es típicamente de 0,2 a 0,5 g/dL menor al plasma, principalmente debido a la pérdida del fibrinógeno (que se consume en la formación del coágulo). La principal proteína presente tanto en suero como en plasma es la albúmina, la cual constituye en la práctica cerca de la mitad de las proteínas totales (Barao *et al.*, 1998).

1. Eritrocitos.

Los eritrocitos o glóbulos rojos son las células circulantes más numerosas, con valores que típicamente rondan los varios millones por microlitro en mamíferos. Los valores de referencia de los principales valores eritrocitarios para caballo y burro están reflejados en la Tabla 1. Dependiendo de la especie, el volumen de dichos eritrocitos supone entre un cuarto y la mitad del volumen sanguíneo. La función primaria de los eritrocitos es el transporte de la hemoglobina a lo largo del organismo, la cual es la encargada a su vez de movilizar el oxígeno a los tejidos.

Los glóbulos rojos se generan a nivel de la médula ósea mediante el proceso conocido como eritropoyesis. Durante el mismo, las células madre hematopoyéticas se transforman en eritrocitos cargados con hemoglobina. Este proceso es controlado en animales sanos por el nivel de oxígeno a nivel celular, que a su vez determina la

producción de la hormona eritropoyetina a nivel renal. Durante la eritropoyesis, las células madres antecesoras sufren una serie de divisiones consecutivas y van diferenciándose, estando toda su evolución regulada por una serie de factores de transcripción e interacciones con otras células y sustancias humorales. De forma académica se suele diferenciar la denominada eritropoyesis basal (encargada de reemplazar aquellos eritrocitos destruidos de forma normal por senescencia) de la eritropoyesis por estrés, que aparece en respuesta a estímulos anémicos como la pérdida de sangre, hemólisis o gestación (Harvey, 2012).

En un primer paso la célula madre totipotente, también denominada hemocitoblasto, se transforma en un progenitor común, capaz de formar cualquier célula circulante salvo el linfocito (Akashi *et al.*, 2000). Esta célula, dependiendo de las señales de su entorno, puede derivar en células progenitoras granulocíticas-monocíticas, progenitoras megacariocíticas-eritroides y progenitores de macrófagos-células dendríticas. Dichos progenitores se diferencian por una serie de marcadores de superficie y son capaces de expresar factores de transcripción y factores de crecimiento específicos. En el caso del progenitor eritroide-megacariocítico, prosigue su diferenciación hacia una célula denominada unidad formadora eritroide o en su denominación inglesa *Burst-Forming Unit- Erythroid* (BFU-Es) y posteriormente en *Colony-Forming Unit-Erythroid* (CFU-E). La CFU-E ya da lugar al primer ancestro eritroide que puede ser fácilmente reconocido mediante microscopía, el rubriblasto (Olver, 2010). Los rubriblastos prosiguen su diferenciación, reduciendo su tamaño e incrementando paulatinamente la cantidad de hemoglobina citoplasmática, a la vez que van condensando la cromatina nuclear (a lo largo de las fases de prorubricito, rubricito basofílico, rubricito policromatófilo y metarubricito). Una vez alcanzada la fase de metarubricito se produce la extrusión nuclear, quedando un eritrocito policromatófilo o reticulocito que puede teñirse con tinciones derivadas del azul de metileno. A excepción de los equinos, como se verá más adelante, estos reticulocitos son liberados de la médula ósea y pasan a circulación. Los reticulocitos contienen residuos de organelas (mitocondria, aparato de Golgi, ribosomas, etc.) y suelen presentar un volumen 30-35% superior al eritrocito maduro (Steinberg *et al.*, 2005). A lo largo de su maduración en la circulación, los reticulocitos ganan hemoglobina y van perdiendo organelas, volumen, numerosas proteínas de superficie, etc. (Johnstone *et al.*, 1991). En el caso de los equinos, muy

raramente se observan reticulocitos en circulación, incluso bajo condiciones de regeneración medular marcada (Weiss y Moritz, 2003) y únicamente analizadores automáticos muy específicos (Advia 120) has sido capaces de detectar números muy bajos de reticulocitos circulantes en casos puntuales de anemia marcada (Cooper *et al.*, 2005).

Los glóbulos rojos están rodeados de una membrana deformable y permeable compuesta de lípidos, proteínas y carbohidratos. Alteraciones en dicha membrana (principalmente en los fosfolípidos o colesterol, pero también en el citoesqueleto) pueden conllevar cambios en la conformación y formas anómalas en los eritrocitos. Las proteínas de membrana (espectrina, actina, entre otras) conforman el citoesqueleto y el mismo es el responsable del mantenimiento de la forma e integridad celular (Olver *et al.*, 2010).

La morfología del eritrocito varía entre especies en veterinaria, si bien en todos los mamíferos los glóbulos rojos son anucleados -al contrario que en otros vertebrados como las aves o reptiles-. En general, los eritrocitos son de redondeados a bicóncavos en la mayoría de mamíferos, con la excepción de los camélidos, que presentan glóbulos rojos ovalados (Barger, 2010). La forma de disco bicóncavo es evolutivamente muy ventajosa, ya que permite a la célula una alta tasa de intercambio de oxígeno con los tejidos circundantes y un alto grado de deformabilidad para poder atravesar capilares de diámetro incluso inferior al del eritrocito. Esa forma bicóncava también provoca que al teñir los eritrocitos suela aparecer un halo central pálido (ya que en dicha zona se concentra menos hemoglobina). No obstante, este halo es mucho más evidente en algunas especies como los caninos y prácticamente inapreciable en otras como el gato, los equinos o los rumiantes (Barger, 2010). La morfología eritrocitaria suele ser una ayuda importante para el hematólogo, pues permite evidenciar algunas alteraciones típicas e incluso clasificar algunos tipos de anemias.

Los glóbulos rojos de los mamíferos muestran una elevada diversidad en cuestión de tamaño, desde los 18 fL de media que presenta la cabra doméstica hasta los 160 fL del oso hormiguero gigante (Gascoyne y Hawkey, 1992). El tamaño eritrocitario no está correlacionado en los mamíferos con el tamaño total del animal, sino que presenta una correlación inversamente proporcional a la concentración de eritrocitos circulantes (Hawkey *et al.*, 1991; Katyukhin *et al.*, 1998). El conocimiento de dicho tamaño es importante pues, en el examen hematológico directo, el patólogo clínico suele ayudarse

de la relación de tamaño del leucocito con el eritrocito para clasificar los distintos subtipos de glóbulos blancos.

En caballos los eritrocitos presentan un diámetro de 5 a 6 μm , presentando una vida media de 140 a 155 días (Adili y Melizi, 2014). De forma más exacta, atendiendo a recientes estudios morfométricos sobre frotis sanguíneos realizados con microfotografías en caballos, el eritrocito del caballo presenta las siguientes dimensiones (expresadas como rangos de referencia): diámetro de 5,1 a 5,8 μm , circunferencia de 19,4 a 24,1 μm y superficie de 21,6 a 30,7 μm^2 (Adili y Melizi, 2014). Comparativamente, los eritrocitos equinos muestran unas dimensiones mayores a las de otros grandes animales de interés veterinario (rumiantes), pero menores al perro en el citado estudio. En el caso de los burros existen muy pocas referencias sobre el tamaño eritrocitario, siendo los estudios sobre este aspecto muy antiguos y con un marcado carácter subjetivo. Así, por ejemplo, en el año 1924, Lloyd y Johnson clasificaron las especies parasitadas por mosquitos en base a sus diámetros eritrocitarios en varias regiones de Nigeria. En este estudio se estableció que el diámetro del glóbulo rojo del asno tenía un valor de entre 5,7 y 6,6 μm . No obstante, estos autores incluyeron al burro en el grupo de animales con glóbulos rojos de tamaño mediano-grande, donde también se encontraba el facóquero, sin intentar diferenciar los eritrocitos de ambas especies. Más recientemente, en 1978, se estudió el tamaño eritrocitario en 100 burros adultos iraníes de entre 2 y 5 años. Para ello se analizaron frotis sanguíneos teñidos con la técnica de Wright y se calculó el diámetro de 1000 eritrocitos mediante un microscopio con un ocular calibrado (Nayeri, 1978). Los resultados de este estudio mostraron un diámetro medio de $6,3 \pm 0,6 \mu\text{m}$ en hembras y $6,4 \pm 0,6 \mu\text{m}$ en machos, siendo ambos datos significativamente diferentes.

El conocimiento del tamaño eritrocitario y su variación intraindividual también tiene aplicaciones para el diagnóstico de cuadros anémicos y su clasificación como patologías regenerativas o arregenerativas. Dado que en equinos no se liberan reticulocitos a circulación durante cuadros de estrés medular o respuesta regenerativa a un insulto anémico, la evaluación de la regeneración medular es harto difícil en los mismos. Esta ausencia de reticulocitos circulantes también ha sido constatada en burros (Nayeri, 1978). El reconocimiento de una respuesta regenerativa en caballos también se complica por la baja tasa de renovación eritroidea específica en equinos. Así, por ejemplo,

mientras que la médula ósea en felinos puede llegar a producir hasta 500.000 nuevos eritrocitos por microlitro y día bajo máxima estimulación, en el caso del caballo esta cifra baja a 150.000 células (Weiser y Kociba, 1982). Esta producción representa únicamente un triple de la tasa normal de renovación eritroide para el caballo.

Inicialmente, la regeneración en equinos se estimaba basándose en mediciones seriadas del hematocrito a lo largo del tiempo, determinaciones bioquímicas de los eritrocitos circulantes (aumentos en la creatinina, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y ATP) o bien mediante estudios citológicos de médula ósea (Smith y Agar, 1976; Radin *et al.*, 1986). No obstante, ninguno de estos parámetros se correlaciona correctamente con el grado de anemia y la mayoría tiene una aplicabilidad escasa. En numerosas especies el Volumen corpuscular medio (volumen medio de la población eritrocítica, también conocido por sus siglas en inglés MCV -*Mean Corpuscular Volume*-) aumenta en cuadros regenerativos debido a la liberación de policromatófilos, de mayor tamaño al de los glóbulos rojos maduros (Shull, 1981; Radin *et al.*, 1986). De forma genérica, y en todas las especies estudiadas, se describe a dichos policromatófilos o macrocitos como células con un tamaño cercano al doble del estándar específico (Radin *et al.*, 1986). Tal y como se comentará más adelante, el MCV puede calcularse de forma indirecta -a partir del hematocrito y del número total de glóbulos rojos circulantes- o de forma directa mediante mediciones en analizadores hematológicos. La aparición y aumento en la concentración de macrocitos se correlaciona directamente con el aumento en el hematocrito y la hiperplasia eritroide a nivel medular, mostrándose pues como un signo específico y válido para la detección de regeneración en caballos. La máxima variación diaria intraindividual definida para el MCV en caballos se sitúa en 1 fL, por lo que tasas de variación mayores a 2 fL se han definido como indicadoras de regeneración en esta especie (Radin *et al.*, 1986). Sin embargo, para que el valor medio de MCV vare significativamente es necesaria una elevada concentración de macrocitos circulantes, por lo que otros parámetros como la distribución del tamaño eritrocitario o el análisis de eritrogramas pueden dar mucha más información y permitir un diagnóstico más precoz de cuadros de regeneración en equinos.

La determinación de la amplitud de distribución eritrocitaria o *Red blood cell Distribution Width* (RDW) es facilitada por los analizadores automáticos más modernos, y puede ser utilizada como una medición de la anisocitosis (variación en el tamaño

eritrocitario) presente en el animal. Este valor representa el grado de variabilidad en el tamaño de los eritrocitos circulantes y, por tanto, se puede utilizar como indicador de la presencia de macrocitos o policromatófilos. No obstante, en estudios de anemia inducida mediante hemorragia en caballos, el RDW no se correlacionó correctamente con la regeneración eritroide, al menos en el grupo de hemorragia menos severa (Radin *et al.*, 1986). Es por ello por lo que los autores de este último trabajo postularon que en cuadro con una hematopoyesis menos marcada podría no observarse una elevación tan marcada en el número de macrocitos como sería de esperar.

Así pues, en conclusión, en los equinos estudiados -caballos- una respuesta regenerativa se suele caracterizar por un incremento en el MCV (de entre 10 y 15 fL sobre niveles basales) (Jain, 1986). Respecto al RDW, sus valores de referencia suelen presentar un rango mucho más amplio en caballo respecto a otras especies, moviéndose entre el 14 y el 25%. Aumentos en los valores de RDW también podrían indicar un cuadro regenerativo (una vez se descarten otras causas de anisocitosis, como cuadros ferropénicos). En la actualidad no existen trabajos en burros que especifiquen de forma tan completa el reconocimiento de cuadros regenerativos basándose en el MCV o RDW.

Factores como la especie, el sexo, la edad, la raza, el ejercicio, la gestación o lactancia pueden influir en diversas variables eritrocitarias equinas, tales como el número total de glóbulos rojos o la concentración de hemoglobina de los mismos (Harvey *et al.*, 1984; Masoni *et al.*, 1985; Aceña *et al.*, 1995; Hansen *et al.*, 2006; Roy *et al.*, 2010; Zobra *et al.*, 2011; Aoki e Ishii, 2012; Hoque *et al.*, 2013; Mariella *et al.*, 2014). Otras variables como el nivel de estrés, la localización geográfica y altitud de la zona donde el animal habite también pueden influir en dichos parámetros. (Kolb, 1975; George *et al.*, 2008). A continuación, se revisarán los efectos sobre los eritrocitos de estos factores en equinos.

1.1. Factores que condicionan el eritrograma en équidos.

A) Especie (caballos versus burros). En la Tabla 1 se recogen los rangos de referencia para caballos, así como numerosos rangos obtenidos por distintos estudios en asnos, de forma comparativa. Los burros suelen presentar unos contajes totales de eritrocitos más bajos que los caballos, así como un volumen corpuscular medio mayor (Brown and Cross, 1969; Zinkl *et al.*, 1990). Así pues, el MCV en burros puede variar

entre 55,6-57,9 fL. En trabajos más antiguos, donde el MCV se obtenía de forma indirecta calculada, este parámetro variaba entre 42 fL en hembras y 47 fL en machos (Nayeri, 1978). Igualmente, se ha constatado que la concentración de hemoglobina y el hematocrito de los asnos es ligeramente inferior a los valores que presentan los caballos (Zinkl *et al.*, 1990). Hay que destacar que estos parámetros hematológicos varían en gran medida dependiendo del instrumental utilizado para su medición. Al igual que sucede en caballos, los burros no suelen presentar reticulocitos circulantes en números suficientes como para la detección mediante técnicas manuales o por los analizadores más comúnmente utilizados en la clínica equina (Gupta *et al.*, 1992). Es por ello por lo que la respuesta regenerativa medular en burros suele reconocerse por la aparición de una elevada cantidad de policromatófilos. Existen numerosos estudios centrados en las variaciones tanto hematológicas como bioquímicas en burros dependiendo del sexo, raza y edad. No obstante, los variables resultados de los mismo, determinados frecuentemente por el uso de distintos equipos, así como las distintas razas de burro utilizadas en cada estudio no permite extrapolar de forma genérica estos resultados (Burnham, 2002).

Por último, y dada su importancia clínica, hemos de comentar que el eritrocito del burro presenta un antígeno específico (conocido como el factor burro, o en inglés, *donkey factor*). Este antígeno no aparece en los glóbulos rojos del caballo y se sospecha que es el causante de la aparición de cuadros de isoeritrolisis neonatal en mulos (cruce de burro macho con una yegua). No obstante, dado que no todos los mulos desarrollan esta enfermedad, se piensa que existen factores no reconocidos adicionalmente que pueden influir en su aparición. Los caballos no presentan de forma natural anticuerpos frente a este factor burro. Este último punto permite por tanto que en mulos afectados por isoeritrolisis se puedan realizar transfusiones desde caballos machos o yeguas que no se hayan cruzado anteriormente con un garañón (Traub-Dargatz *et al.*, 1995).

B) Estrés y miedo. Los equinos presentan una elevada variabilidad intraindividual a nivel del hematocrito que es muy característica y única entre los mamíferos. Esto se debe a la presencia de un bazo de gran tamaño con la capacidad de almacenar entre 6 y 12 L de sangre rica en eritrocitos durante periodos de relajación y descanso (Persson, 1967; McKeever *et al.*, 1993). Esta gran cantidad de glóbulos rojos temporalmente secuestrados a nivel esplénico puede transferirse rápidamente a circulación en respuesta a un estímulo o ejercicio (Persson, 1967). Esta respuesta se debe a la liberación de

catecolaminas, que provocan la contracción de la cápsula y septos esplénicos, ricos en musculatura lisa en los equinos. Esta capacidad de respuesta esplénica depende de la edad, raza, nivel de entrenamiento y/o ejercicio. En general, se ha observado que el tiempo necesario para que los parámetros eritroides vuelvan a niveles basales tras dicha esplenotomía depende del nivel de excitación provocada al animal y varía entre 40 minutos y varias horas (Jain, 1986). Así pues, el estrés puede interferir en las determinaciones de los parámetros eritroides en equinos (Rose y Hodgson, 1994), dando lugar a incrementos en los valores de hemoglobina (Hb), hematocrito (HCT) y en el conteo total de eritrocitos (*Red Blood Cell Count* o RBC) debido a la esplenotomía que aparece en respuesta a la liberación de catecolaminas (Kurosawa *et al.*, 1998). Entre los factores que pueden provocar dicha esplenotomía cabrían destacar el ejercicio, condiciones adversas externas como una elevada temperatura o humedad, trasportes prolongados, ambiente desconocido, cambios de la rutina diaria, alejamiento de ambientes sociales conocidos, así como una venipunción dolorosa y prolongada, entre otros (Friend, 2001). De forma general se acepta que una venipunción de más de treinta segundos puede dar lugar a una lectura del hemograma alterada, pues se obtendría una muestra representativa de dicha esplenotomía (Persson, 1967; Kurosawa *et al.*, 1998).

C) Alimentación. La alimentación también puede llegar a provocar cambios en el eritrograma. De forma específica, se han observado incrementos en el hematocrito y en la concentración de proteínas totales plasmáticas tras la administración de la comida. Este hallazgo podría explicarse por la relativa pérdida o paso de fluidos del torrente circulatorio a los fluidos gastroentéricos (Kerr y Snow, 1982). También se han observado variaciones en parámetros eritroides relacionadas con el tipo de dieta y la concentración de sales administradas a los caballos (Greppi *et al.*, 1996). Es por ello por lo que se recomienda evitar tomar muestras en las 3 horas después de una alimentación a base de concentrado o grano para asegurar la máxima objetividad en los datos obtenidos.

D) Sexo, gestación y lactancia. El sexo del caballo también influye en estos parámetros, observándose unos niveles superiores de Hb, RBC y HCT en los machos respecto a las hembras, probablemente debido al efecto de los andrógenos sobre la eritropoyesis (Jain, 1986). Las variaciones en los valores hematológicos de la serie roja relacionadas con la gestación y lactancia han sido ampliamente investigadas en la yegua,

si bien los resultados obtenidos no han sido homogéneos entre los distintos autores. En los primeros estudios sobre el tema se observó una ligera anemia en los periodos finales de la gestación (Trum, 1952). No obstante, trabajos posteriores han encontrado un incremento de los niveles eritroides durante dicho periodo (Berlink *et al.*, 2000). Estos parámetros se mantienen constantes durante el parto (Taylor-Macallister *et al.*, 1997), incrementándose ligeramente tras el mismo una vez se recupera el equilibrio hidroelectrolítico. Por último, la lactancia provoca reducciones en HCT, RBC y Hb (Harvey *et al.*, 1994).

En burros, uno de los primeros trabajos enfocados a determinar la presencia de variaciones entre géneros para parámetros hematológicos (Nayeri, 1978), constató un mayor RBC en hembras, pero menores HCT, Hb, MCV, MCH (*Mean Corpuscular Hemoglobin*, también conocida en español como Hemoglobina Corpuscular Media) y MCHC (*Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration*, también conocida en español como Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media). El autor concluyó que este hallazgo podría deberse al mayor tamaño eritrocitario en el macho, que se compensaría en hembras a base de más eritrocitos. Sin embargo, en un estudio más reciente con más de 200 animales sólo se observó que el MCHC era mayor en las hembras (Zinkl *et al.*, 1990). Otros autores también han reportado diferencias intersexuales en el eritrograma asnal, tales como mayores RBC (Pitel *et al.*, 2006; Etana *et al.*, 2011), HCT (Nayeri, 1978), y Hb (Nayeri, 1978) en machos. En algunos de estos estudios se ha sugerido que estas variaciones se debían al efecto inhibitor sobre la eritropoyesis de los estrógenos sexuales, cuya concentración es mucho mayor en la hembra (Kerr, 2002; Girardi *et al.*, 2015).

A pesar de lo comentado, la mayoría de los trabajos más recientes centrados en determinar variaciones hematológicas dependientes del sexo en asnos han descartado la presencia de las mismas, en tanto en cuanto las hembras no estuviesen a final de lactación o en periodo de lactancia. (Dinev y Khubenov, 1986; Cubeddu *et al.*, 1991; French y Patrick, 1995; Folch *et al.*, 1997; Yakubu *et al.*, 2008; Bonelli *et al.*, 2015; Laus *et al.*, 2015). Cuando se ha investigado la hematología de hembras durante dichos momentos, sí que se han observado variaciones respecto a los machos que son parcialmente semejantes a las que presentan las yeguas en periodos similares, si bien no totalmente extrapolables. Así, por ejemplo, la burra muestra un descenso en los valores del

hematocrito y el conteo de glóbulos rojos durante el parto y la primera semana de lactación, que podría estar relacionado con el aumento en la ingesta de agua debido a la pérdida de fluidos (Bonelli *et al.*, 2015).

E) Edad. La influencia de la edad en los parámetros hematológicos equinos ha sido extensivamente estudiada en diversas razas equinas (Ralston *et al.*, 1988; McFarlane *et al.*, 1998; Cebulj-Kadunc *et al.*, 2002), existiendo además trabajos centrados en los cambios que se producen durante la maduración del potro (Harvey *et al.*, 1984; Jain, 1993) y los que acontecen en caballos geriátricos (McFarlane *et al.*, 1998). En el potro neonato existe aún una población de eritrocitos fetales remanentes con un tamaño ligeramente superior al de los glóbulos rojos maduros que da lugar a un mayor MCV, Hb y HCT. Estos parámetros comienzan un rápido descenso en las primeras 12 a 24 horas de vida, siendo el mismo más gradual en las dos semanas posteriores y asemejándose a valores de adultos al alcanzarse aproximadamente el primer o segundo año de vida (Jain, 1986; Harvey, 1990; Grondin y Dewitt, 2010). Estos cambios en el potro neonato se suelen relacionar con la destrucción de los eritrocitos fetales, la liberación de catecolaminas durante el parto y la expansión del volumen plasmático por la toma de fluidos con el calostro. Más tarde, dichos parámetros siguen disminuyendo a consecuencia de la reducción de la supervivencia del eritrocito adulto respecto al fetal, el descenso en la llegada de hierro a la médula ósea y una eritropoyesis menos acelerada a consecuencia de la mayor saturación de oxígeno sanguínea (Harvey, 1990). En el caso del MCV, alcanza su nadir a los 3-5 meses de edad (Jain, 1986; Harvey, 1990) y posteriormente se eleva hasta valores de adulto al año de edad (Harvey, 1990). Durante los dos primeros años de vida en equinos, los valores de hematocrito y hemoglobina suelen ser menores respecto a los típicos de adultos, si bien otros parámetros como la MCHC suelen ser constantes y similares a adultos (Stewart *et al.*, 1970). Tras este periodo, en el tercer y cuarto año de vida, existe un incremento gradual del MCV y MCH con un pequeño descenso en el número total de eritrocitos circulantes, manteniéndose constante tanto el hematocrito como la concentración global de hemoglobina. (Jain, 1986; Ralston *et al.*, 1988).

La microcitosis (bajo MCV) observada en equinos jóvenes se suele asociar a un cuadro de ferropenia relativa debido al incremento en la demanda de hierro durante el crecimiento del animal. Estos glóbulos rojos de reducido tamaño pueden a veces ser tan

pequeños que algunos contadores automáticos de impedancia pueden mostrar problemas para reconocerlos como eritrocitos, generándose valores artefactualmente erróneos de MCV, RBC y HCT. La anisocitosis moderada también ha sido descrito como un hallazgo típico en el frotis de equinos jóvenes (Harvey, 1990), normalmente debido a la citada coexistencia de microcitos y eritrocitos de tamaño normal durante este periodo de la vida del potro.

En el caso de los burros, el trabajo de Zinkl demostró diferencias según la edad (disminución de RBC y aumento de MCV en animales más viejos). Esos mismos hallazgos, junto con un aumento de MCH, han sido también observados por otros autores (Folch *et al.*, 1997; Caldin *et al.*, 2005; Pitel *et al.*, 2006; Ahmed *et al.*, 2007; Laus *et al.*, 2015).

En investigaciones más recientes en burros se ha intentado determinar la importancia de estos cambios y su duración durante la maduración del animal. Así pues, se ha constatado que los ruchos presentan valores hematológicos marcadamente distintos a los burros adultos, por lo que los mismos han de ser interpretados con sumo cuidado por los clínicos. Al igual que sucede con los potros y los ponis inmaduros, la concentración de hemoglobina, los glóbulos rojos totales y el hematocrito son mayores durante las primeras horas de vida del rucho y descienden de forma significativa durante la primera semana postparto (Veronesi *et al.*, 2014). Este hallazgo podría explicarse por el descenso en la producción de eritrocitos (al aumentar la oxigenación sanguínea, disminuye la producción de eritropoyetina), el aumento en la destrucción eritroide por parte del bazo y/o la hemodilución por la toma de calostro y otros líquidos. El resto de valores hemáticos (MCV, MCH, MCHC y RDW) suelen mantenerse constantes durante las primeras semanas de vida en burros, si bien tanto el MCV como la MCH muestran valores superiores a los de los potros (por ejemplo, los ruchos presentan un MCV medio de entre 44 y 52 fL). También se pueden observar variaciones hematológicas entre burros jóvenes -de un año de edad- y burros adultos. Por ejemplo, los contajes de glóbulos rojos y el valor RDW suelen ser mayores en animales de un año de edad al compararse con burros adultos (Zakari *et al.*, 2015). La concentración de hemoglobina también suele ser superior en animales de menos de un año de edad respecto a asnos mayores (Orlandi *et al.*, 1997; Ahmed *et al.*, 2007; Etana *et al.*, 2011). Una posible explicación para estos valores elevados en animales de menos de un año de edad sería que los mismos sufren un

mayor estrés (y por tanto esplenotransfusión) durante la toma de muestras (Girardi *et al.*, 2015). Al igual que se ha descrito para potros, en burros jóvenes es típico encontrar una mezcla en la población eritroide de microcitos y macrocitos, que da lugar a elevados valores de RDW comparados con burros de edad más avanzada. Se ha propuesto que este hallazgo es debido a la presencia de un cuadro de ferropenia generalizado durante los primeros años de vida en burros, si bien no todos los autores coinciden en apoyar esta hipótesis (Brown y Cross, 1969; Zinkl *et al.*, 1990). En general se acepta que tanto el MCV como MCH aumentan con la edad (Folch *et al.*, 1997).

F) Raza. La raza también afecta a los valores eritroides en equinos, siendo típico el hallazgo de valores superiores de RBC, hemoglobina y hematocrito en razas denominadas “de sangre caliente” respecto a aquellas de “sangre fría” (Jain, 1993; Kramer, 2000; Grondin y Dewitt, 2010). Así, por ejemplo, valores de hematocrito tan bajos como el 24% pueden encontrarse en ciertas razas de caballos y ponis de sangre fría, los cuales a su vez muestran un MCV mayor. Un caso especialmente interesante es el caballo miniatura, el cual presenta unos niveles de hemoglobina, hematocrito y contajes de eritrocitos significativamente inferiores a otras razas, si bien su MCV, MCH y MCHC son significativamente mayores (Harvey *et al.*, 1984).

En burros, al compararse poblaciones de burro doméstico en Inglaterra y poblaciones salvajes en los Emiratos Árabes Unidos, se observaron ciertas variaciones en RBC, Hb y PCV (*Packed Cell Volume* o hematocrito obtenido mediante centrifugación), siendo dichos parámetros mayores en la población salvaje. Estos cambios se achacaron a un mejor estado atlético en la población salvaje (Turnbull *et al.*, 2002).

G) Ejercicio. El ejercicio provoca cambios significativos en el eritrograma, siendo los mismos dependientes del tipo y duración del mismo, del nivel de entrenamiento y habituación del animal a dicho ejercicio y de las condiciones ambientales (Rose y Allen, 1983). En general, el ejercicio aumenta los niveles de Hb, HCT y RBC. Al iniciarse el ejercicio, dichas variaciones se deben a la esplenotransfusión y movilización de eritrocitos desde el bazo debido a la liberación de catecolaminas. Este incremento en el volumen eritroide total conlleva un aumento en la capacidad de transporte de oxígeno sanguínea y por tanto en la capacidad aeróbica del equino. Tal y como hemos comentado, la respuesta variará según la duración e intensidad del ejercicio, ya que estos parámetros

influyen en la magnitud de la liberación de catecolaminas (Kurosawa *et al.*, 1998). Además de esta esplenotransfusión, también habría de tenerse en consideración el cambio en la distribución de fluidos corporales que se produce durante el ejercicio (McKeever *et al.*, 1993). Estos cambios descritos son típicos en ejercicios máximos de corta duración, observándose más raramente pequeñas elevaciones en el MCV y disminuciones en MCH y MCHC (Smith *et al.*, 1989; Geor *et al.*, 1992). En el caso de ejercicios submáximos prolongados (tipo *endurance* o *raid*), el incremento en el hematocrito, hemoglobina y contajes de rojos suele relacionarse mayormente con la deshidratación por el sudor.

La habituación del atleta equino, es decir el nivel de entrenamiento que presente, también puede influir en los parámetros de los eritrocitos (Rose y Allen, 1983). Se ha observado que caballos entrenados para carreras y ejercicios rápidos suelen presentar HCT, RBC y Hb significativamente mayores a otros caballos sanos, lo cual se considera una adaptación durante dicho entrenamiento para responder a la mayor demanda de oxígeno. (McKeever *et al.*, 1993). En caballos trotones el entrenamiento prolongado e intensivo puede provocar un incremento excesivo en el número de glóbulos rojos, un fenómeno conocido como hipervolemia por ejercicio, que da lugar a una reducción en los resultados de estos animales debido al incremento en la viscosidad sanguínea causante de una reducción en la perfusión capilar e inadecuada utilización del oxígeno circulante (Golland *et al.*, 2003). En caballos entrenado para *endurance* o *raid*, no obstante, se suele observar justo lo contrario, una reducción paulatina en los niveles de hemoglobina, hematocrito y en el contaje de eritrocitos (Robert *et al.*, 2010).

En la actualidad no existe ningún estudio que haya abordado los cambios que aparecen a nivel hematológico en burros según el ejercicio realizado o el nivel de habituación al mismo.

H) Otros factores. Los ritmos circadianos también producen variaciones en el eritrograma equino, observándose elevaciones en HCT y Hb a lo largo de la noche al comparar sus niveles con los que se observan durante el día (Gill y Rastawicka, 1986). Otros factores como la estación del año o la altitud también pueden provocar variaciones en los parámetros hemáticos. En general, en caballos, se acepta que RBC, HCT y Hb presentan variaciones durante las estaciones del año, con un ligero descenso en los parámetros citados durante el invierno en varias razas equinas (Gill y Wanska, 1978; Gill

et al., 1979). Por su parte, en animales viviendo en elevadas altitudes, se suelen observar aumentos en RBC, HCT y Hb como respuesta compensatoria al menor contenido de oxígeno del aire atmosférico (Wickler y Anderson, 2000).

El uso de tranquilizantes como los derivados de las fenotiacinas (acepromazina, clorpromazina) y los agonistas α -2 adrenérgicos (xilacina, romifidina, detomidina, etc.) afecta los valores hematológicos eritroides significativamente. Estos fármacos provocan una relajación de la musculatura lisa de la cápsula esplénica, promoviendo el acúmulo de eritrocitos a nivel esplénico (Jeffcott, 1977) e igualmente dan lugar a una prolongada hipotensión (tras un periodo breve inicial de hipertensión) que incrementa el volumen plasmático y reduce los contajes eritroides debido a la hemodilución asociada (Jain, 1986).

2. Leucocitos.

Los leucocitos son la población celular menos numerosa en la sangre de los mamíferos. La proporción de las distintas poblaciones leucocitarias varía según la especie, siendo típicamente los neutrófilos los más numerosos en carnívoros y equinos y los linfocitos en rumiantes y roedores. La evaluación de la concentración total y las concentraciones de las distintas subpoblaciones leucocitarias es una herramienta muy útil en el diagnóstico hematológico veterinario. El leucograma compila tanto dichas concentraciones como la presencia o ausencia de alteraciones morfológicas en las mismas. Un leucograma anómalo puede ayudar a orientar el diagnóstico, si bien normalmente no permite el establecimiento de un diagnóstico exacto. De forma genérica, en los mamíferos domésticos, se reconocen las siguientes poblaciones leucocitarias circulantes mayoritarias: polimorfonucleares o granulocitos (que a su vez se dividen en neutrófilos, eosinófilos y basófilos), linfocitos y monocitos. De forma esporádica, y en mucha menor proporción, otras células circulantes -como los mastocitos- también pueden observarse en el frotis sanguíneo.

La maduración de los granulocitos se produce a partir de las células madres totipotenciales a nivel de médula ósea, teniendo lugar en los nichos vasculares de los senos centrales de la misma (Lévesque *et al.*, 2007). A partir de estas células iniciales se generan dos tipos de progenitores: los linfoides y los mieloides (comunes a los ya

descritos para los eritrocitos). En la actualidad se acepta que los progenitores mieloides pueden derivar a su vez en células progenitoras granulocíticas-monocíticas, progenitoras megacariocíticas-eritroides y progenitores de macrófagos-células dendríticas.

En el caso de los progenitores granulocítico-monocíticos, estas células dan lugar a distintas poblaciones (precursor monocítico, precursores del neutrófilo, precursores del eosinófilo y precursores comunes del basófilo-mastocito) (Radín y Wellman, 2010). A su vez, el precursor común basófilo-mastocito puede dar lugar a ancestros del basófilo (que permanecen en médula ósea) o a progenitores del mastocito (que se liberan a circulación y maduran en tejidos como la mucosa gastrointestinal, la piel, el pulmón o el corazón). En el caso de neutrófilos, eosinófilos y basófilos, la evolución celular que se produce en la médula ósea es similar y todos los precursores reciben un nombre parecido. El mieloblasto suele ser el primer eslabón reconocible morfológicamente, presentando un citoplasma que carece de gránulos específicos (tipo I) y en el que en periodos más tardíos de su evolución comienzan a aparecer los primeros gránulos primarios o azurofílicos (tipo II). Los gránulos secundarios aparecen en la fase de promielocito y son claramente discernible en la fase de mielocito. Las siguientes fases de cada una de las subpoblaciones (metamielocitos y granulocitos bandados) ya son incapaces de dividirse y únicamente sufren una maduración nuclear con marcada condensación de la cromatina y segmentación progresiva nuclear, si bien en la misma siguen formándose los gránulos secundarios y se disciernen claramente los gránulos terciarios. Durante estas fases se produce igualmente la maduración de los gránulos citoplasmáticos (Radín y Wellman, 2010).

En el caso de los monocitos, estas células también se originan a nivel de la médula ósea a partir del mentado progenitor común mieloides de tipo granulocítico-monocítico. Estas células pueden dar lugar a monocitos maduros tras dos cortos pasos evolutivos a nivel de médula ósea (monoblasto y promonocito). El origen de las células dendríticas es mucho más complejo y está menos caracterizado, existiendo subpoblaciones de las mismas que se clasifican como monocíticas o mieloides y otras como linfoides (Papenfuss, 2010).

Por último, la linfopoyesis se produce a nivel de médula ósea a partir de los precursores ya comentados, si bien el proceso de maduración y especialización de las

distintas subpoblaciones linfocitarias requiere de la participación del timo y los órganos linfoides secundarios como los nódulos linfáticos, bazo, etc.

2.1. Características fisiológicas de las distintas poblaciones leucocitarias presentes a nivel hemático en equinos.

➤ Neutrófilos.

Suele ser la población de leucocitos más abundante en la sangre de los équidos y tienen funciones eminentemente defensivas, participando muy activamente en la respuesta inflamatoria gracias a sus propiedades quimotácticas y fagocíticas (Nabity y Ramaiah, 2010). Los neutrófilos se originan en la médula ósea a partir de células mieloides y en condiciones normales únicamente se observan en circulación las formas maduras o neutrófilos segmentados y los denominados neutrófilos bandados. Los neutrófilos bandados tienen un núcleo con forma de herradura, U o C, de paredes paralelas y sin constricciones en la membrana nuclear. Los neutrófilos segmentados tienen un núcleo también en forma de herradura, pero con un número variable de indentaciones, invaginaciones y constricciones a lo largo de su perímetro. El citoplasma del neutrófilo presenta numerosos gránulos de tamaño pequeño y que usualmente se tiñen pobremente con tinciones hematológicas, siendo de incoloros a ligeramente azulados. Según estudios con microscopía electrónica y dependiendo de la composición enzimática de los mismos se distinguen tres tipos de gránulos en el citoplasma del neutrófilo: gránulos primarios o azurofílicos, gránulos secundarios o específicos y gránulos terciarios o de gelatinasa (Nabity y Ramaiah, 2010). Los gránulos primarios son ricos en mieloperoxidasa, siendo el resto negativos para dicha enzima. Si bien inicialmente se suponía que dichos gránulos eran lisosomas, en la actualidad, y tras estudios minuciosos sobre la presencia de determinados receptores y proteínas en su membrana, se clasifican como organelas secretoras especializadas.

Los neutrófilos circulan entre 5 - 10 horas en el torrente circulatorio antes de pasar a los tejidos periféricos. El tamaño medio del neutrófilo equino varía entre 10 y 15 μm (Grondin y Dewitt, 2010). En el caso de los burros, el trabajo de Nayeri describió un diámetro medio de $12,9 \pm 1,8 \mu\text{m}$ en hembras y $11,8 \pm 2,2 \mu\text{m}$ en machos. Este estudio se realizó determinando mediante microscopía y objetivo calibrado el tamaño de 1000

neutrófilos (Nayeri, 1978). Los neutrófilos se liberan a circulación desde médula ósea en respuesta a la demanda tisular existente, la cual queda patente por medio de numerosas sustancias humorales circulantes como las interleuquinas y quemoquinas. Los neutrófilos liberados al torrente circulatorio pueden acumularse en el denominado *pool marginal* (adheridos al endotelio en diversos órganos, como los pulmones o el intestino). Los neutrófilos de este *pool marginal* pueden movilizarse en cualquier momento hacia circulación, sirviendo como una reserva activa en caso de necesidad. Igualmente, también hay un paso constante y mantenido de neutrófilos circulantes al *pool marginal* (Lassen y Swardson, 1995; Grondin y Dewitt, 2010).

Los denominados corpúsculos de Barr pueden observarse fácilmente en los neutrófilos de yeguas y burras, apareciendo como una pequeña prolongación con forma de baqueta que sobresale del núcleo celular, estando unido al núcleo por una banda fina de cromatina. Dicho corpúsculo representa el segundo cromosoma X de la hembra en su disposición heterocromática fisiológica en células somáticas (Faye *et al.*, 2007).

Los neutrófilos bandados son menos frecuentemente observados en equinos que en otras especies de interés veterinario (Grondin y Dewitt, 2010). Así, por ejemplo, se ha descrito que, en cuadros de infecciones bacterianas, los bandados pueden llegar como mucho a suponer entre el 1 y el 10% del total del contaje diferencial de leucocitos (Welles, 2000). Cuando un animal presenta un aumento en la proporción o cantidad de neutrófilos bandados se suele hablar de la presencia de desviación a la izquierda. Los neutrófilos hipersegmentados -que caracterizan la denominada desviación a la derecha- son muy raramente observados en sangre de equinos sanos y se reconocen por presentar 5 o más lobulaciones marcadamente separadas. Además de un envejecimiento *in vivo* celular, por cuadros de sobredemanda y prolongación de la circulación de los neutrófilos en la sangre, este hallazgo también se observa cuando la sangre ha envejecido de forma artefactual o *in vitro*. De forma más puntual, también se ha descrito un cuadro de hipersegmentación neutrofilica idiopática en caballos *Quarter Horse* sin evidencias de clínica asociada (Prasse *et al.*, 1981). Igualmente, la presencia de neutrófilos hiposegmentados también se ha descrito en un caballo árabe aparentemente sano, lo cual condujo al diagnóstico de Síndrome de Pelger-Huët (Grondin *et al.*, 2007).

➤ Linfocitos.

Son células inmunes circulantes que provienen del timo, médula ósea y órganos linfoides secundarios. La vida media del linfocito equino varía entre 20 y 200 días (Schalm y Carlson, 1982), existiendo, al igual que en los neutrófilos, un *pool marginal* no circulante. La población circulante está compuesta a su vez de varias subpoblaciones, que no se pueden distinguir entre sí en extensiones típicas hematológicas. Los linfocitos B son responsables de la inmunidad humoral y los linfocitos T de la inmunidad celular. A su vez los linfocitos T se pueden clasificar como citotóxicos (Tc), supresores o reguladores (Treg) o linfocitos T *helper* (Th), pudiendo estos últimos a su vez separarse según las citoquinas que producen en Th1, Th2, Th3 y Th17 (Day, 2010). Por último, existe una pequeña población circulante diferenciada compuesta por las células *Natural Killer* y los linfocitos grandes granulares. En equinos la mayoría de linfocitos circulantes son células T (38 – 66 %), seguidas de células B (17 – 38 %) y el resto células *Natural Killer* (<5 %) (McGorum *et al.*, 1993). Los linfocitos, a nivel de frotis sanguíneos, se reconocen por su forma redondeada, pequeño tamaño y núcleo de redondo a ovalado, presentando una cantidad mínima de citoplasma usualmente claro a incoloro. El tamaño normal de los linfocitos equinos varía entre 7 - 12 μm (Latimer y Rackich, 1992), siendo típicamente los leucocitos de menor tamaño en el frotis sanguíneo. En el caso del burro, su tamaño (hembra/macho) es de $9,2 \pm 1,4$ y $8,9 \pm 1,8$ μm respectivamente (medición de 1000 linfocitos) (Nayeri, 1978). La cantidad de citoplasma puede variar, siendo típicos en la sangre felina y equina la presencia de linfocitos con mayor cantidad de citoplasma. Menos frecuentemente se pueden observar en el frotis sanguíneo los denominados inmunocitos o linfocitos reactivos, caracterizados por un citoplasma intensamente basófilo y un núcleo de morfología más irregular, que a veces puede presentar indentaciones o una forma ameboide (Capomaccio *et al.*, 2011). De forma genérica se acepta que dichos linfocitos reactivos se corresponden a células B con una alta producción de inmunoglobulinas, mostrando raramente un halo perinuclear más claro que podría corresponderse con la zona de acúmulo de sáculos del aparato de Golgi. En el frotis normal de un equino, si se tiñe con tinciones derivadas de Wright adecuadamente, hasta el 5% de los linfocitos pueden presentar pequeños gránulos citoplasmáticos de color magenta y forma irregular, correspondiéndose los mismos a linfocitos granulares (Grondin y Dewitt, 2010). En el caso de los caballos, la aparición tanto de inmunocitos

como linfocitos granulares se asocia a una marcada activación antigénica (Ricketts *et al.*, 2006).

➤ Monocitos.

Los monocitos forman parte del sistema monocito-macrófago-histiocitario y tienen funciones inflamatorias y fagocitarias muy importantes. En caballos esta población es la tercera más abundante de entre los leucocitos y suele representar menos del 10% de los mismos. (Ricketts *et al.*, 2006). A nivel sanguíneo, el monocito suele representar una forma intermedia evolutiva o de maduración, mostrando capacidad de migrar hacia los tejidos en caso de ser necesario y transformarse en macrófago. Además de estas funciones en inmunidad innata, también tienen un papel eminente en la inmunidad adquirida, siendo una de las principales células presentadoras de antígenos a los linfocitos. Estas células también son las encargadas de la eritrolisis de glóbulos rojos ya envejecidos y del reciclaje y metabolismo del hierro de los mismos (Weiss y Souza, 2010). A nivel morfológico, los monocitos suelen ser las células de más difícil identificación en el frotis sanguíneo en veterinaria. El núcleo de esta célula puede presentar cualquier forma, desde ovalado a forma de habichuela, ameboide o en forma de herradura -como los neutrófilos- (Grondin y Dewitt, 2010). La cromatina del núcleo del monocito suele estar menos condensada que en el neutrófilo, lo cual puede ayudar en su reconocimiento a nivel del frotis sanguíneo. También ayuda a la diferenciación con otras células su gran tamaño y el aspecto de su citoplasma, que suele ser grisáceo. En el caso del burro, su tamaño se estableció por Nayeri en 1978 rondando los 10 μm , si bien únicamente se midieron 80 monocitos. Raramente los monocitos pueden presentar pequeños gránulos purpúreos en su citoplasma. Los monocitos también presentan un *pool marginal*, además de la población circulante. Si bien suele asociarse a un hallazgo artefactual, por un prolongado almacenamiento de la muestra en tubos con EDTA, el citoplasma de los monocitos a veces puede presentar unas pocas vacuolas claras de tamaño variable localizadas en la periferia celular (Jain, 1993; Bienzle, 2000).

➤ Eosinófilos.

Los eosinófilos presentan numerosas funciones inmunitarias y en nada acotan su acción a cuadros alérgicos o parasitarios, como erróneamente se suele sugerir. Estas células contienen un increíble arsenal de compuestos enzimáticos y mediadores inflamatorios que actúan en cuadros inflamatorios, en la quemotaxis y median numerosas respuestas fisiológicas y patológicas; si bien es cierto que muchos de estos compuestos son centrales en la respuesta orgánica a invasiones parasitarias y en cuadros inmunomediados o autoinmunes (Meadows y Young, 2010). La morfología del eosinófilo es variable entre las distintas especies de mamíferos. En común, todos los eosinófilos presentan un núcleo segmentado similar al del neutrófilo, si bien el número de lobulaciones suele ser inferior -a veces únicamente 2-. A nivel citoplasmático, estas células muestran unos característicos gránulos muy prominentes, de color rojizo a anaranjado según la especie y que bajo tinción son similares a los eritrocitos. En el caso de los equinos esta célula suele presentar un aspecto de mora o frambuesa debido al elevado número de gránulos redondeados arracimados que se acumulan en su citoplasma (Grondin y Dewitt, 2010). Dichos gránulos suelen ser de gran tamaño y en numerosas ocasiones llegan a ocultar al núcleo. Si bien es más característico en ciertas razas caninas, como los galgos, eventualmente también se puede observar en frotis equinos eosinófilos degranulados, bien sea *in vivo* o durante la manipulación y tinción de la muestra, quedando espacios vacuolados en su citoplasma (Latimer, 1999; Grondin y Dewitt, 2010). En burros su tamaño ronda entre 13 y 14 μm (Nayeri, 1978), siendo significativamente mayores en las hembras.

➤ Basófilos.

Los basófilos son unos granulocitos cuya función es actualmente poco conocida. Si bien presentan enzimas y mediadores similares a los eosinófilos, también acumulan ciertos compuestos similares a los mastocitos, por lo que se presupone que han de desarrollar funciones inmunomoduladores parecidas a estas células. Normalmente los basófilos son la población leucocitaria más escasa en circulación y en numerosas ocasiones no se encuentran al realizar un contaje diferencial rutinario. Son células de tamaño grande, mayores a los neutrófilos, y núcleo segmentado como el resto de

granulocitos. En equinos estas células se caracterizan por un citoplasma con numerosos gránulos de color violáceo oscuro que a veces pueden oscurecer el núcleo (Grondin y Dewitt, 2010). Nayeri determinó un tamaño medio de 13 μm para el basófilo asnal (aunque sólo se midieron 20 células).

Al igual que sucedía para los parámetros eritroides, existen numerosos factores que pueden provocar variaciones en los índices leucocitarios en equinos. A continuación, se detallarán los principales condicionantes de estos valores.

2.2. Factores que condicionan el leucograma en equinos.

A) Especie (caballos versus burros). En la Tabla 1 se recogen las concentraciones medias de cada subpoblación leucocitaria tanto en asnos como en caballos. Además de las variaciones en el tamaño de cada subtipo celular (comentadas anteriormente), ciertos autores han indicado la presencia de leves diferencias entre ambas especies. Así, por ejemplo, los resultados de Zinkl mostraban un menor número de neutrófilos bandados en burros comparado a caballos, siendo los eosinófilos ligeramente mayores y el resto de subpoblaciones prácticamente idénticas. Estas diferencias no han sido confirmadas por autores posteriores, probablemente porque la comparación entre datos de ambas especies también ha de tener en cuenta la raza de cada una de ellas, la localización geográfica, sexo, edad, etc.

B) Estrés y miedo. El denominado leucograma de excitación o leucocitosis fisiológica aparece debido a la liberación de epinefrinas por el eje simpático-adrenal. Tanto la adrenalina como la noradrenalina liberadas durante el ejercicio intenso, miedo o excitación conlleva la contracción esplénica y la movilización del *pool marginal* de neutrófilos y linfocitos debido a la reducción en la adherencia neutrofílica al endotelio y la vasodilatación a nivel de microvasculatura (Latimer, 1999). Esta cascada de eventos produce una leucocitosis con neutrofilia madura y linfocitosis. En casos más raros también se puede observar monocitosis y eosinofilia por reclutamiento desde médula ósea y *pool marginal* (Snow *et al.*, 1983; Welles, 2000). Todos estos cambios descritos suelen ser transitorios y, por ejemplo, los neutrófilos liberados desde el *pool marginal* vuelven a su localización a los 20-30 minutos del insulto, tardando los linfocitos menos de una hora en regresar a niveles basales (Rossdale *et al.*, 1982).

Por su parte, el llamado leucograma de estrés aparece en respuesta a la liberación de corticoides bajo situaciones estresantes. Los glucocorticoides dan lugar a una leucocitosis con neutrofilia madura, linfopenia y eosinopenia. La neutrofilia deriva de la movilización del *pool marginal*, reclutamiento desde médula ósea y reducción de la adherencia neutrofilica al endotelio y capacidad de migración a tejidos. La linfopenia se produce debido al secuestro desde tejidos linfoides y la eosinopenia por la marginalización a vasos periféricos y disminución de la liberación desde médula ósea (Caracostas *et al.*, 1989; Welles, 2000). Esta respuesta suele aparecer entre 2-4 horas tras el evento que eleva los niveles endógenos de corticoides (Rossdale *et al.*, 1982; Burguez *et al.*, 1983), regresando a valores normales tras unas 24 horas (Welles, 2000).

C) Sexo, gestación y lactancia. Existe controversia acerca de la existencia de variaciones intersexuales para el leucograma equino. Varios estudios han encontrado diferencias significativas en la concentración de leucocitos y granulocitos entre sexos (Lassen y Swardson, 1995; Cebulj-Kadunc *et al.*, 2002), si bien dichas observaciones no han podido ser replicadas e incluso se contradicen entre sí. Por su parte, uno de los últimos estudios que ha afrontado este tema no ha constatado diferencias en estos valores entre caballos de distinto sexo (Lacerda *et al.*, 2006). En las hembras, tanto la gestación como el ciclo estral parecen no variar sustancialmente la composición del leucograma (Berlink *et al.*, 2000; Da Costa *et al.*, 2003). En cuanto al parto, si bien ciertos autores reportan la presencia de leucocitosis con neutrofilia, linfopenia y eosinopenia por activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales (Silver *et al.*, 1984; Harvey *et al.*, 1994), otros autores no han podido corroborar este hallazgo (Taylor-Macallister *et al.*, 1997). Finalmente, durante la lactancia sí que se ha observado una leucopenia con un grado proporcional al nivel de estrés que aparece durante la máxima producción de leche (Harvey *et al.*, 1994).

En el caso de los burros, el trabajo de Nayeri determinó varias diferencias no significativas (mostrando las hembras menores contajes de leucocitos -en inglés, *White Blood Cell Count* o WBC- y recuentos de linfocitos y monocitos, pero mayores recuentos de eosinófilos). Sin embargo, en el trabajo de Zinkl y colaboradores, en 1990, se determinó que las hembras presentaban un mayor número de leucocitos y neutrófilos (Zinkl *et al.*, 1990). Otros estudios más recientes en asnos no han reportado diferencias en el perfil hematológico dependiendo del sexo, (French y Patrick, 1995, Folch *et at.*, 1997, Yakubu y Chafe, 2008, Laus *et al.*, 2015). En burras, al igual que se ha comentado

para yeguas, hay varios estudios centrados en las variaciones del leucograma durante la gestación, parto y lactancia. Durante el parto y varios días tras el mismo, se suele observar en la burra un aumento estadísticamente significativo en el número de glóbulos blancos, el cual se ha justificado por la liberación de cortisol y catecolaminas en esta fase (Bonelli *et al.*, 2015).

D) Edad. Uno de los campos más estudiados en hematología equina es la variación de los valores leucocitarios en individuos de distintas edades. Los neutrófilos son muy escasos en el feto equino y representan menos de 1.500 células por microlitro en fetos de menos de 300 días de gestación. No obstante, tras el parto, y debido a la elevada liberación de cortisol, los niveles se elevan hasta 8.000 células por μL . Estos valores van descendiendo gradualmente hasta los niveles de adultos -sobre unas 4.000 células por μL - a lo largo de los primeros 4-6 meses de edad del potro (Harvey, 1990; Allen *et al.*, 1998). En el caso de los linfocitos, su concentración es baja al nacimiento del potro -de media unos 1.400 por μL -, aumentando a 5.000 linfocitos por μL a los 3 meses de edad y alcanzando valores de adulto al año de edad (Jain, 1986; Harvey, 1990). Tras este tiempo el número de linfocitos circulantes va paulatinamente descendiendo con la edad del animal, mientras que los neutrófilos se mantienen más o menos estables, por lo que el ratio neutrófilos:linfocitos va variando conforme avanza la edad, hasta alcanzar valores de 2:1 en caballos geriátricos (Jain, 1993; Lassen y Swardson, 1995). En el caso de los eosinófilos, su número es muy bajo en potros hasta los 4 meses de edad, siendo inferior a 400/ μL (Harvey, 1990). Debido a la exposición a distintos alérgenos y parásitos a lo largo de la vida del animal, este número se va incremento de forma proporcional a la edad del mismo (Jain, 1993).

En el caso de los burros, se han observado disminuciones en los contajes linfocitarios y aumentos en los eosinófilos de forma paralela a la edad (Zinkl *et al.*, 1990; Folch *et al.*, 1997), si bien dichos hallazgos no han sido observados de forma continua y han sido rebatidos por otros autores (Laus *et al.*, 2015).

En otro trabajo también se observó que el número total de glóbulos blancos varía en burros durante la primera semana de vida, aumentando de los 4-12.000 por μL presentes en los tres primeros días de vida a los 6-15.000 que aparecen entre el día 3 y 7. Los niveles en el séptimo día de vida ya son equiparables a los que presentan los burros adultos (Veronesi *et al.*, 2014). Este incremento parece ser causado por un aumento en el

número de linfocitos y monocitos, mientras que los neutrófilos segmentados solo aumentan ligeramente tras el nacimiento. La razón tras este hallazgo podría ser la liberación de cortisol que se produce durante el parto. Estas variaciones provocan que el ratio neutrófilos:linfocitos pase de 2,8 al nacimiento a 1 al primer año de vida. El resto de poblaciones leucocitarias, es decir eosinófilos y basófilos, no sufren cambios significativos a lo largo de este periodo de vida, si bien los niveles que se han observado en muchos son consistentemente mayores a los que muestran potros de edades semejantes.

También se pueden observar variaciones hematológicas entre burros jóvenes -de un año de edad- y burros adultos (Zakari *et al.*, 2015). Por ejemplo, los contajes de linfocitos y monocitos suelen ser mayores en animales de un año de edad al compararse con burros adultos. En contraste, el número de neutrófilos segmentados es generalmente menor en animales jóvenes (Caldin *et al.*, 2005). En el caso de los neutrófilos, los contajes suelen mostrar una tendencia al alza, igualando valores de burros de edad avanzada entre los 10 y 18 meses de edad. Algo similar sucede con los eosinófilos, que muestran un aumento progresivo durante los dos primeros años de vida en burros. Este incremento podría responder a un hallazgo idiosincrásico en burros o bien a una carga parasitaria creciente y continua en estos animales durante su maduración. De forma conjunta, a lo largo de su vida, los burros muestran un declive en el número total de leucocitos circulantes, disminuyendo los neutrófilos y manteniéndose los linfocitos (Stanisic *et al.*, 2015).

E) Raza. Se han observado diferencias mínimas en el leucograma entre distintas razas equinas. Así, por ejemplo, los caballos de sangre caliente suelen presentar un contaje de leucocitos mayor a caballos linfáticos (Jain, 1986; Harvey *et al.*, 1984). También se han descrito otras variaciones, como por ejemplo ratios neutrófilos:linfocitos de 1:0 en caballos árabes y *Thoroughbreds*, frente a valores de 1,7 en caballos de sangre fría y 0,7 en caballos miniatura (Jain, 1986). En burros, Zinkl también observó diferencias raciales (contajes leucocitarios ligeramente diferentes en burros salvajes) (Zinkl *et al.*, 1990).

F) Ejercicio. El leucograma equino también responde al ejercicio, mayormente por efecto combinado de los corticoides y las epinefrinas. En ejercicios intensos y cortos -carreras o *sprints*- se puede observar una leucocitosis con neutrofilia y linfocitosis, siendo esta última mucho más marcada (Snow *et al.*, 1983). Por su parte, en ejercicios

mantenidos y de larga duración como el *endurance* o *raid*, se suele observar una leucocitosis con neutrofilia y linfopenia debido a la combinación de esplenotomía y liberación de corticoides endógenos (Snow *et al.*, 1982).

G) Otros factores. También se han observado variaciones en el leucograma según los ciclos circadianos diarios. Así, por ejemplo, Allen y Powell (1983) observaron contajes de linfocitos mayores a última hora del día respecto a las mañanas. Este hallazgo podría relacionarse con la liberación de corticoides endógenos en caballos, mostrando la misma un marcado ritmo circadiano con valores mayores a primeras horas de la mañana (McKeever, 2011).

3. Plaquetas.

Las plaquetas o trombocitos son las siguientes células más numerosas en circulación tras los eritrocitos, con valores típicos en equinos de $100 \times 10^3/\mu\text{L}$. Las plaquetas son fragmentos citoplasmáticos de los megacariocitos medulares y contienen numerosas organelas citosólicas. El origen del megacariocito es común al de los precursores eritroides anteriormente citados, existiendo dos pasos intermedios de maduración (megacarioblasto y promegacariocito). La forma de las plaquetas es variable, apareciendo normalmente como discos aplanados. Las plaquetas juegan un papel primordial en la hemostasis y coagulación, proveyendo una superficie para la formación de los complejos tenasa y protrombinasa, centrales en la activación de la trombina y en la definitiva formación del coágulo de fibrina encargado de restaurar el daño vascular (Boudreaux, 2010b). Cuando las plaquetas se exponen al colágeno, laminina y fibronectina presentes en la pared de los vasos circulantes -dichos compuestos en condiciones fisiológicas no entran en contacto con las plaquetas, pues se hallan recubiertos por el endotelio del vaso sanguíneo- sufren una activación que conlleva la adhesión de las mismas al defecto vascular. A través de una serie de complejas cascadas de señales y con la participación de numerosos receptores de membrana, dichas plaquetas van formando un primer esqueje de coágulo al unirse entre ellas, reclutando igualmente numerosos factores circulantes de la coagulación. Las plaquetas presentan en su citoplasma organelas como mitocondrias, una red de canalículos que pueden abrir para

aumentar su superficie de adhesión y liberar sustancias procoagulantes, así como tres tipos de gránulos: densos, alfa y lisosomiales (King y Reed, 2002).

De todas las especies de interés veterinario, los equinos presentan el conteo plaquetario más bajo (Boudreaux, 2010a). Las plaquetas equinas son de pequeño tamaño si se comparan con las caninas o felinas y tienen un volumen medio de 5 fL (Boudreaux y Ebbe, 1998). Suelen presentar un citoplasma azulado con gránulos poco discernibles (Kramer, 2000) y raramente muestran pseudópodos desde dicho citoplasma. La presencia de plaquetas gigantes o macroplaquetas (de diámetro mayor al eritrocito) ha sido descrita en equinos y se ha asociado a una trombopoyesis activa (Walton, 2014).

El tamaño plaquetario medio en caballos es de 2,5-3,5 μm (Boudreaux, 2010a), mientras que su volumen medio o *Mean Platelet Volume* (MPV) varía entre 4,3 y 5,6 fL (Boudreaux y Ebbe, 1998). Las plaquetas equinas tienen un Componente Medio Plaquetario (*Mean Platelet Component* -MPC- en inglés) de $26,2 \pm 3,5$ g/dL (Segura *et al.*, 2007). Este parámetro novedoso, calculado únicamente por ciertos analizadores, determina el grado de activación plaquetaria (a mayor activación, menor granularidad plaquetaria y menor es el MPC). Por último, el ancho de la distribución del componente plaquetario o PCDW en caballos se suele situar en $7,9 \pm 1,2$ g/dL (Segura *et al.*, 2007). De forma calculada, se ha constatado que, en caballos, la observación de 6 a 10 plaquetas por campo de 400 aumentos en un frotis sanguíneo se suele correlacionar con una concentración adecuada plaquetaria (Boudreaux, 2010a). En la actualidad no existen estudios específicos sobre estos parámetros en burros.

Respecto a las variaciones que fisiológicamente se pueden observar en los parámetros plaquetarios en equinos, cabe destacar el efecto del anticoagulante sobre las plaquetas. Si bien el resto de parámetros hemáticos, como se verá más tarde, se suelen evaluar en sangre con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) como anticoagulante, al haberse descrito en caballos cuadros de pseudotrombocitopenia dependiente del uso de EDTA (Hinchcliff *et al.*, 1993), se aconseja el uso de otros anticoagulantes (citrato sódico) para la evaluación correcta de parámetros plaquetarios.

De forma general, al contrario que lo demostrado en mujeres, las yeguas no muestran variaciones en los parámetros plaquetarios durante la gestación, parto o

lactación (Harvey *et al.*, 1994; Berlink *et al.*, 2000). No obstante, en burras, sí que se ha observado un descenso moderado en el número de plaquetas circulantes durante el parto y varios días tras el mismo (Bonelli *et al.*, 2015).

Tampoco se han observado variaciones en el número de plaquetas circulantes a lo largo del primer año de vida en equinos (McFarlane *et al.*, 1998), si bien otros autores sí que han reportado un descenso paulatino en los contajes con la edad del caballo (Ralston *et al.*, 1988; Jain, 1993).

El efecto del ejercicio en los parámetros plaquetarios equinos es dependiente de la intensidad de dicho ejercicio. Así, por ejemplo, ejercicios máximos de corta duración dan lugar a un aumento en la trombocitemia, mientras que ejercicios moderados no parecen tener efecto sobre las plaquetas (Bayly *et al.*, 1983).

En los pocos trabajos que han abordado las variaciones en los parámetros plaquetarios en los burros, se ha demostrado que los mismos se mantienen estables durante las primeras semanas postparto, si bien el contaje total plaquetario sí que es significativamente más elevado en ruchos al compararlo con burros adultos (Veronesi *et al.*, 2014). En burros de menos de un año de edad el valor de PDW (*Platelet Distribution Wide*, o amplitud de distribución trombocitaria, es decir, la variabilidad en el tamaño de las plaquetas presentes en el animal) es superior al de los adultos (Caldin *et al.*, 2005).

Se han descrito numerosas diferencias en las glicoproteínas plaquetarias entre caballos y burros (Boudreaux y Humphries, 2013). La presencia de aloantígenos plaquetarios específicos en burros podría, por tanto, explicar la aparición de trombocitopenia neonatal aloinmune en mulos, de forma paralela al cuadro de isoeritrolisis neonatal. En mulos afectados, los anticuerpos ingeridos con el calostro se unen a las plaquetas y ocupan los puntos de anclaje al colágeno, provocando además de la citada trombocitopenia un fallo en el proceso de agregación plaquetaria (Ramirez *et al.*, 1999). Dada la importancia de este cuadro, y la existencia constada de isoeritrolisis neonatal debida al factor burro, se aconseja que los mulos nacidos de yeguas cruzadas con un garañón no tomen el calostro de la madre y se les proporcione fuentes adicionales de inmunoglobulinas para prevenir complicaciones hematológicas.

Tabla 1. Rangos de referencia en hematología asnal comparados con caballos.

	BURROS									CABALLOS
	Zinkl 1990	French 1995	Folch 1997	Turnbull 2002	Mori 2004	Caldin 2005	Pitel 2006	Couroucé 2008	Yakubu 2008	Fielder 2016
RBC (x10 ⁶ /μL)	6,6	5,5	6,8±1,2	7,6	6,8	5,2±0,7	6,1	5,4±0,8	4,6±1,3	6-10,4
Hb (g/dL)	13,1	11,6	12,4±2,5	15	12,9	11,4±1	10,6	11,1±1,6	-	10,1-16,1
HCT (%)	38	33	36±5	45	38	28,5 ± 3	37,6	32,1±4,5	30,3±3,3	27-43
MCV (fL)	57,9	64	54.1±7	59	55,4	54,6±2	52,5	59,6±3,0	-	37-49
MCH (pg)	19,9	21,9	19.1±2	-	18,8	22,1±1	18,0	-	-	13,7-18,2
MCHC (g/dL)	34,3	34,8	34.6±1	33,3	34,2	40±1	34,4	34,5±0,7	-	35,3-39,3
WBC (x10 ³ /μL)	10,3	10,2	9,6±1,8	10,2	8,2	9,8±2,3	12,1	10,9±3,2	10,2±4,1	5,6-12,1
Neu (x10 ³ /μL)	4,7	5,0	4,3±1,2	6,1	3,4	4,6±1,6	5,6	4,9±1,6	48,9±10,6	2,9-8,5
Eos (x10 ³ /μL)	0,58	0,4	0,6±0,5	0,3	0,4	0,7±0,4	0,9	1,4±0,6	2,5±2,5	0-0,8
Bas (x10 ³ /μL)	0,04	0,00	0,02±0,06	0,05	0,03	-	0,07	0,1±0,0	1,1±1,1	0-0,3
Mon (x10 ³ /μL)	0,51	0,13	0,2±0,2	0,51	0,1	0,3±0,2	0,5	0,4±0,1	7,1±3,0	0-0,7
Lym (x10 ³ /μL)	4,4	4,2	4,2±1,2	3,79	4,1	4,0±1,1	4,9	4,2±0,1	40,2±14,1	1,2-5,1
PLT (x10 ³ /μL)	-	-	236±82,1	140-450	-	220±72,1	280	248±75	-	117-256
N	165	>200	71	62	38	30	83	68	50	
Método				CellDyn 3500	Impedancia	ADVIA 120	ADVIA 120		Manual	
Origen	EE.UU	Inglaterra	España	Emiratos Árabes	Brasil	Italia	Francia	Francia	Nigeria	

Tabla 1 continuación. Rangos de referencia en hematología asnal comparados con caballos.

	BURROS						CABALLOS
	Nayeri 1978		Burden 2016	Girardi 2015	Laus 2015	Stanisic 2015	Fielder 2016
	M	H					
RBC (x10 ⁶ /μL)	7,8±1,7	8,3±1,5	4,4-7,1	6,02±0,95	4,1-7,7	5,9-7,1	6-10,4
Hb (g/dL)	13,2±1,9	11,9±1,4	8,9-14,7	11,4±1,5	10,1-14,6	11,2-12,5	10,1-16,1
HCT (%)	35,7±4,9	33,6±3,6	27-42	37±4,2	28-42	34-38	27-43
MCV (fL)	47,2±10,1	41,9±28,1	53-67	-	47,5-63	53,0-57,5	37-49
MCH (pg)	17,6±4,3	14,9±3,1	17,6-23,1	-	17,2-20	17,1-18,8	13,7-18,2
MCHC (g/dL)	36,6±5,5	35,6±3,6	31-37	-	33,8-37,5	31,9-3,3	35,3-39,3
WBC (x10 ³ /μL)	13,7±2,7	13,3±3,1	-	10,39±2,08	6,5-16,7	11,9-17	5,6-12,1
Neu (x10 ³ /μL)	5,2±1,1	5,2±0,9	2,4-6,3	5,07±1,38	1,6-8,5	-	2,9-8,5
Eos (x10 ³ /μL)	1,1±0,5	1,2±0,4	0,1-0,9	0,47±0,29	0-1,9	-	0-0,8
Bas (x10 ³ /μL)	0,002±0,01	0,01±0,03	0-0,1	0,00±0,04	0-0,2	-	0-0,3
Mon (x10 ³ /μL)	0,1±0,1	0,05±0,1	0-0,7	0,26±0,14	0-0,8	-	0-0,7
Lym (x10 ³ /μL)	7,4±1,1	6,8±1,1	2,2-9,6	4,43±1,50	3,0-10,2	4,6-7,5	1,2-5,1
PLT (x10 ³ /μL)	-	-	95-384	324±114	75-368	171-283	117-256
N	50	50	136	69	189	52	
Método	manual		XT-2000i	Impedancia	CELL-DYN 3500	Impedancia	
Origen	Irán		Inglaterra	Brasil	Italia	Balcanes	

Datos expresados como media±desviación estándar, media o rango intercuartil según referencia. RBC: células rojas; Hb: hemoglobina; HCT: hematocrito; MCV: volumen corpuscular medio; MCH: hemoglobina corpuscular media; MCHC: concentración de hemoglobina corpuscular media; WBC: leucocitos; Neu: neutrófilos; Eos: eosinófilos; Bas: basófilos; Mon: monocitos; Lym: linfocitos. PLT: recuento plaquetario; N=número de animales estudiados; M = machos; H= hembras.

CAPÍTULO 2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS HEMATOLÓGICO.

Una vez hemos realizado una revisión de los principales componentes sanguíneos, pasaremos a detallar las técnicas de estudio hematológico más ampliamente utilizadas en hematología veterinaria, con especial atención al examen del frotis sanguíneo, los contajes diferenciales manuales, el análisis mediante equipos automáticos y la morfometría hemática.

Previamente hemos de realizar un breve repaso a distintos factores analíticos y condicionantes que pueden alterar los resultados en las pruebas hematológicas, llegando a tener importancia tanto a nivel clínico como a nivel de investigación en hematología.

En primer lugar, para la mayoría de pruebas hematológicas (salvo algunas excepciones como aquellas centradas en la funcionalidad plaquetaria y similares), el anticoagulante de elección siempre es el EDTA (ácido etilen-diaminotetraacético) (Schalm *et al.*, 1975). Históricamente se empleaban tubos con añadido de sal tripotásica de EDTA para el análisis hematológico, comercializándose incluso tubos con dicha sal en formato sólido (polvo). En la actualidad la mayoría de tubos de hematología presentan una fina película en spray de sal dipotásica de EDTA, que permite una adecuada anticoagulación de la muestra y extiende la durabilidad de dichos tubos. Este anticoagulante mantiene de forma adecuada la morfología de las células hemáticas y permite un adecuado reconocimiento de las mismas tanto por parte del patólogo clínico como por parte de los analizadores automáticos. En general, se desaconseja el uso de heparina de litio como anticoagulante para muestras hematológicas, ya que puede falsear los resultados de hematocrito debido a la hinchazón de las células al contacto con este producto. El EDTA tiene no obstante el inconveniente de tener cierta tendencia a provocar agregados plaquetarios y leucocitarios (Auffray *et al.*, 2009). En casos donde la presencia de dichos agregados interfiera con los contajes automáticos o manuales, se puede obtener la muestra en tubos con citrato sódico. La agregación celular tiende a ser más marcada en muestras que han sido refrigeradas o conservadas durante largos periodos de tiempo y, por tanto, un procesado rápido tras la recolección de sangre puede evitar o disminuir la formación de agregados celulares.

En equinos, la mayoría de los parámetros hematológicos pueden ser determinados tanto en muestras con EDTA como con heparina de litio como anticoagulante, sin que existan diferencias significativas entre los valores obtenidos entre ambos tipos de anticoagulante, si bien el primer anticoagulante es el preferido por su adecuada conservación morfológica celular. No obstante, sí que se han detectado descensos marcados en todos los parámetros evaluados cuando la sangre se ha testado en tubos con citrato sódico (Sharif *et al.*, 2010).

Para pruebas hematológicas siempre sería preferible la recolección de la muestra directamente en tubos con vacío, evitando posibles alteraciones que puedan suceder durante la manipulación de la sangre si tenemos que traspasarla de la jeringa a un tubo sin vacío. Este tipo de tubos también permite un llenado adecuado respetándose la proporción de muestra respecto al anticoagulante. En casos donde no se respeta dicha proporción, se pueden observar alteraciones artefactuales de los resultados tales como la disminución del hematocrito debido al exceso de anticoagulante (efecto dilucional). Durante la toma de muestra hemos de ser cuidadosos y evitar hemólisis iatrogénica, que interferirá con distintas mediciones eritrocitarias (Schalm *et al.*, 1975). Es extremadamente importante en la toma de muestra realizar una venipunción limpia que evite contaminación de la muestra y activación de las plaquetas. La toma de muestras directamente de líneas de catéter debería evitarse, pues suele asociarse a la aparición de errores artefactuales e incluso contaminación con heparina si el mismo está siendo tratado para evitar la trombosis de la vena (Braun *et al.*, 2015). Igualmente, siempre está indicado el uso de agujas de gran calibre (mínimo 20G), evitándose las turbulencias que se provocan con calibres inferiores y que aumentan la hemólisis y activación plaquetaria.

Las determinaciones hematológicas han de realizarse lo antes posible tras la toma de la muestra. No obstante, determinaciones muy rápidas (<10 minutos tras la toma de muestra) también se han relacionado con resultados subóptimos (hipotéticamente por un inadecuado equilibrio entre el EDTA del tubo y la muestra sanguínea). De forma genérica se acepta que no han de trascurrir más de 6 horas entre la venipunción y la medición, comenzando a aparecer artefactos si se elonga dicho tiempo de almacenamiento y siendo ideal la medición en las primeras 2 horas post-toma de muestras (Braun *et al.*, 2015). Así, por ejemplo, el almacenaje de la sangre incluso en un periodo corto de 12 horas, suele provocar que los eritrocitos aumenten su MCV, elevándose igualmente el hematocrito y

disminuyendo la MCHC (Geminard *et al.*, 2002; Bourdreauxan, 2010). Los contajes diferenciales de los analizadores automáticos, de forma genérica, disminuyen su precisión al evaluar muestras almacenadas (Alsaker, 1977). De igual forma, en muestras envejecidas por un almacenaje excesivo, se produce una hinchazón del núcleo leucocitario que puede provocar un falso aumento del número de bandados al realizar el contaje manual diferencial leucocitario (El Quriaghli *et al.*, 2003). El almacenaje también provoca la vacuolización del citoplasma neutrofilico, lo cual puede llegar a confundirse con cambios tóxicos de importancia patológica (Carbonell *et al.*, 1982), apareciendo igualmente apoptosis leucocitaria (picnosis, cariorrexis y cariolisis) que pueden provocar errores en contajes manuales o automáticos (Dabrowski *et al.*, 2007).

De forma ideal, la muestra ha de mantenerse antes de la medición a temperatura ambiente en un equipo que permita su mezcla lenta y gentilmente (balancín) (Braun *et al.*, 2015). Si se va a almacenar la sangre por un periodo mayor a cuatro horas, la misma habría de mantenerse en refrigeración a 4 °C. Nunca habría de someterse la muestra a congelación, pues la hemólisis secundaria evitaría cualquier evaluación de la misma (Braun *et al.*, 2015).

1. Examen macroscópico de la muestra.

El primer examen de la muestra sanguínea ha de ser macroscópico, determinándose la calidad e idoneidad de la misma de forma previa a la realización de cualquier estudio más detallado. Las muestras han de examinarse en busca de coágulos mediante inversión suave. En el caso de los equinos, y tal como se detallará a continuación, los eritrocitos tienden rápidamente a depositarse en el fondo del tubo y el suero a separarse, debido a la formación de los denominados “rouleaux” o pilas de monedas. Este fenómeno es común en la sangre de equinos y felinos sanos y es importante diferenciarlo de la autoaglutinación. El protocolo a seguir para diferenciar ambos procesos se detallará en el apartado de frotis sanguíneo. La presencia de lipemia marcada también puede observarse, sobre todo si se trata de un animal que ha ingerido comida hace poco tiempo o en el caso de los asnos, un animal enfermo (Reid y Mohammed, 1996). La lipemia da lugar a la aparición de un aspecto lechoso en el plasma.

2. Determinación del hematocrito mediante centrifugación.

La técnica de determinación del hematocrito mediante microcentrifugación es ampliamente usada en medicina veterinaria y tiene múltiples aplicaciones (Schalm *et al.*, 1975), aceptándose en la actualidad como la técnica *gold standard* para la determinación del hematocrito por el Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). Para llevar a cabo esta técnica se llena de sangre con anticoagulante un tubo específico de microhematocrito (hasta un 90% de su capacidad) y se sella por un extremo con plastilina. Dicho tubo se centrifuga durante 5 minutos a 11.000-13.000 rpm en una centrífuga específica que permite la separación del plasma de los elementos formes sanguíneos (quedando estos separados en eritrocitos y una estrecha capa denominada *buffy coat*, compuesta mayormente por leucocitos y plaquetas). Cuando se calcula el volumen porcentual ocupado por los eritrocitos en el total de la muestra centrifugada se obtiene el hematocrito por centrifugación, que más correctamente deberíamos definir como PCV (*Packed Cell Volume*) o volumen eritrocitario. Es importante no confundir este valor con el hematocrito calculado o HCT, el cual suele obtenerse mediante analizadores automáticos y suele ser el resultado del múltiplo del número de eritrocitos totales (medición directa, RBC) por el volumen eritrocitario medio o MCV (medición directa). Dado que el HCT es el resultado de un cálculo basado en otros valores, su valor puede comúnmente no coincidir con el PCV.

Es muy importante en esta técnica realizar una centrifugación adecuada, evitándose así que quede plasma atrapado entre los eritrocitos y el valor de PCV sea artefactualmente elevado (Pearson y Guthrie, 1982). El valor obtenido de PCV en una muestra depende del anticoagulante utilizado. El uso de EDTA causa una ligera disminución en el volumen celular dado el aumento en la presión osmótica del plasma, reduciéndose por tanto el hematocrito respecto a su valor *in vivo* entre un 1,5 y un 2% (Salem *et al.*, 1991). Para evitar este artefacto, se aconseja la medición del hematocrito por centrifugación en muestras con heparina de litio como anticoagulante.

Al realizar la técnica de microcentrifugación, el veterinario puede obtener información valiosa para el paciente que no adquiriría con otros métodos hematológicos. Así, por ejemplo, tras la centrifugación podemos observar la calidad y características del

plasma de la muestra y del componente leucocitario-plaquetario (*buffy coat*). El grosor y color del *buffy coat* puede orientar al clínico sobre la presencia de leucocitosis-trombocitosis (*buffy coat* gruesas) o reticulocitos (*buffy coat* amarillenta). Por otra parte, el plasma ha de ser prácticamente transparente en ciertas especies (pequeños animales, cerdos, pequeños rumiantes) o amarillento en caballo (dada la elevada bilirrubinemia). En el caso del burro, el plasma suele presentar un aspecto más cercano al de animales carnívoros que al de otros equinos, sin que se sepa actualmente a qué se debe dicha idiosincrasia. El color del plasma también depende de la presencia de carotenoides en la dieta consumida por el paciente, los cuales dan una coloración anaranjada al mismo. (Kankaanranta *et al.*, 2005). Un color excesivamente amarillento en el plasma puede indicar hiperbilirrubinemia, ya sea por aumento de la bilirrubina indirecta secundario a hemólisis, aumento de la conjugada por fallo biliar o hepático o bien por ayuno en el caso de équidos, dada la disminución que el mismo supone en la tasa de aclaramiento de la forma no conjugada (Battinelli *et al.*, 2007). En caso de observarse una coloración rojiza en el plasma tras la centrifugación se puede presuponer un aumento en la hemoglobinemia, debido a cuadros de hemólisis intravascular o por hemólisis iatrogénica durante el procesado de la muestra.

Tal y como se ha comentado en el apartado de evaluación macroscópica de la muestra, los cuadros de lipemia dan lugar a la aparición de plasma lechoso a blanquecino debido a elevadas concentraciones de lipoproteínas como los quilomicrones o VLDLs (*Very Low Density Lipoproteins*). En caso de lipemias postprandiales predominan los primeros, mientras que las VLDLs son más características de cuadros patológicos. En equinos los cuadros de lipemia son típicos en asnos, ponis y animales obesos, estando relacionadas estas dislipemias con enfermedades endocrinometabólicas como el síndrome metabólico equino, así como con otras enfermedades graves que den lugar a anorexia (Kastner *et al.*, 1980). La presencia de lipemia en la muestra, tal y como se ha comentado, es un artefacto muy comúnmente observado en burros enfermos, presentando esta especie una tendencia idiosincrásica a la aparición de la misma.

El plasma obtenido tras la centrifugación para el cálculo del PCV también puede utilizarse para la medición del total de proteínas plasmáticas mediante refractometría, así como para determinar la concentración de fibrinógeno en el mismo mediante técnicas de precipitación por calor (Deubelbeiss *et al.*, 1975).

Por último, de forma sucinta, hemos de citar determinados equipos que pueden determinar el hematocrito de forma indirecta y que no suelen proporcionar más datos hematológicos. Existen en el mercado diversos analizadores portátiles que miden el hematocrito con métodos de conductividad, como es equipo I-Stat (Abbot), entre otros. Estos equipos se basan en el principio de impedancia (del cual se hablará en la parte de analizadores automáticos hematológicos), presentando el problema de que están internamente calibrados para determinaciones en medicina humana. El resultado de hematocrito en estos analizadores portátiles depende de la temperatura de la muestra, el tamaño de la misma y una composición normal del plasma (respecto a la kalemia, natremia, proteinemia, lipemia y leucograma). Dado que estos equipos están internamente calibrados para muestras de humana (Zelin, 1992), hemos de considerar que existe la posibilidad de fallos en las mediciones en animales de interés veterinario. De igual forma, debido a las muy marcadas diferencias metodológicas, se desaconseja el uso comparativo de los datos obtenidos con estos medidores y los resultados de otros analizadores. También existen en el mercado algunos medidores de oximetría capaces de determinar el valor del hematocrito, si bien en este caso el cálculo es indirecto y está basado en la relación estable (en pacientes sanos) de la hemoglobina con el HCT.

3. Examen citológico del frotis sanguíneo.

El examen citológico de extensiones sanguíneas es una prueba rápida, barata y útil en muchos pacientes equinos. Principalmente, en la actualidad, los frotis sanguíneos se examinan para evaluar alteraciones morfológicas que puedan ayudar en el diagnóstico del animal o permitan explicar alteraciones halladas en el análisis automático hematológico u otras pruebas clínicas. De igual forma, la realización de estos frotis es la base para realizar contajes diferenciales leucocitarios (que se tratarán más adelante) y sirve para determinar la exactitud de los analizadores automáticos, comprobándose los resultados de los mismos. Para que un frotis sea informativo, el mismo ha de prepararse de forma rápida tras la obtención de la muestra, en menos de dos-tres horas, evitándose así la aparición de alteraciones artefactuales en la morfología y aspecto de las células sanguíneas. Para el análisis del frotis será esencial que las células se dispongan en una monocapa, permitiendo su adecuada evaluación y valoración. Si el frotis es demasiado grueso las células no podrán evaluarse ni reconocerse adecuadamente, mientras que en

frotis muy finos los eritrocitos suelen tender a aplanarse y los leucocitos muestran tendencia a la lisis celular (Dabrowski *et al.*, 2007). De forma idónea, los frotis sanguíneos han de prepararse a partir de sangre fresca o sangre con EDTA como anticoagulante. Si se utiliza sangre con heparina de litio como anticoagulante, normalmente se suele observar una tinción rosada a magenta generalizada de las células debido a la presencia de mucopolisacáridos en el anticoagulante (Dabrowski *et al.*, 2007). Los frotis sanguíneos no deberían refrigerarse y siempre sería necesario protegerlos de la condensación (Vap *et al.*, 2012).

Existen diversas técnicas para la preparación de extensiones sanguíneas, siendo la más común aquella en la que la extensión se realiza mediante un portaobjetos. En este método se utilizan dos portaobjetos de vidrio. El primero se coloca sobre una superficie plana y limpia y se vierte una pequeña gota de sangre bien mezclada en el borde del mismo. Este primer portaobjetos se sujeta con una mano mientras se coloca un segundo portaobjetos -extensor- sobre el mismo formando un ángulo de entre 30 y 45 grados. El portaobjetos extensor se ha de colocar antes de la gota de sangre y con cuidado se ha de hacer retroceder, de forma que la misma se extienda en el borde posterior del canto del mismo. Tras esto se ha de realizar un movimiento rápido pero suave del portaobjetos extensor en sentido contrario a la gota de sangre, lo cual provocará la extensión de la misma sobre el primer portaobjetos. El grosor del frotis está influido en esta técnica por el tamaño de la gota depositada, la viscosidad intrínseca de la muestra -es decir, su hematocrito-, así como el ángulo que se forme entre ambos portaobjetos. Respecto a este último factor, a mayor sea el mismo (es decir a más se acerque el ángulo formado entre ambos portaobjetos a 90 grados), más gruesa será la muestra (Dabrowski *et al.*, 2007). Esta modificación será idónea, por ejemplo, para la preparación de frotis sanguíneos a partir de muestras de animales anémicos. Así mismo, a más rápidamente se realice el movimiento de extensión, más corta será el área de la misma. Un frotis adecuadamente preparado se caracteriza por quedar limitado al portaobjetos (es decir, la muestra no se extiende hasta el borde mismo del mismo y no se pierden células al realizar la extensión).

Existen otras técnicas para la preparación de frotis sanguíneos, si bien son menos utilizadas en la actualidad. Así, por ejemplo, se pueden utilizar dos cubreobjetos de vidrio para extender la muestra entre los mismos, colocando una gota de sangre sobre el primero y posando el segundo encima ligeramente girado -en forma de cruz respecto al primero-

para rápidamente retirar el cubreobjetos superior. Estas muestras se pueden fijar de forma similar a las anteriormente descritas, mostrando como ventaja un tamaño inferior.

Tras preparar el frotis hemos de secar el mismo inmediatamente mediante movimientos enérgicos en el aire o manteniéndolo frente a un secador no muy potente con aire templado, pero no caliente. Si el secado se realiza con aire demasiado caliente podría aumentar el porcentaje de células rotas en la extensión. El secado lento de la muestra también puede causar una excesiva contracción de las células, que dificultaría su identificación (Dabrowski *et al.*, 2007). Si la muestra no se seca adecuadamente antes de su fijación, es típica la presencia de pequeñas inclusiones refráctiles en el interior del citoplasma de numerosos eritrocitos (que se corresponden con plasma atrapado).

Los frotis sanguíneos se suelen fijar en metanol, que preserva las características celulares y permite un adecuado mantenimiento de la morfología eritroide y leucocitaria. La fijación de los frotis ha de producirse antes de 4 horas tras la toma de la muestra, siendo preferible no dejar pasar más de una hora para evitar posibles artefactos. El fijador ha de estar libre de agua, pues con tan solo un 3% de agua en la mezcla de metanol, la fijación será deficiente y comenzarán a aparecer artefactos morfológicos como pérdida de detalles celulares y vacuolización (Dabrowski *et al.*, 2007). Antes de su fijación, es conveniente evitar la exposición de las extensiones a vapores formólicos, que pueden provocar una prefijación celular que evitará una posterior visualización correcta de las mismas.

Respecto a la tinción de los frotis sanguíneos, de forma rutinaria, se suelen utilizar técnicas denominadas de tipo Romanowsky (como las tinciones de Wright, la modificación Wright-Giemsa, la tinción de May-Grunwald Giemsa, etc.), tanto manualmente como con más modernos aparatos automáticos de tinción de muestras. Las tinciones tipo Romanowsky están compuestas por una mezcla de eosina y azul de metileno oxidado (Horobin, 2011). Este último tiñe sustancias ácidas, dando lugar a una coloración de azulada a purpúrea, mientras que la eosina tiñe sustancias de carácter básico con un color anaranjado a rojizo. Las características tintoriales de estas técnicas dependen del pH de los colorantes y del agua utilizada para eliminar los restos de la misma. Un pH bajo puede resultar en tinciones excesivamente anaranjadas y poca calidad de los componentes azurófilos, al igual que sucede con un lavado excesivo de la muestra, tiempos inadecuados en el colorante azurófilo o degradación del mismo. Por su parte, un

pH excesivo, tiempos prolongados en el colorante azurófilo o un lavado escaso de los restos del mismo pueden provocar tinciones excesivamente basófilas (Dabrowski *et al.*, 2007).

Un inadecuado mantenimiento de los colorantes o el uso excesivo de los mismos con otro tipo de muestras -citologías cutáneas, etc.- puede provocar la aparición de precipitados de los mismos que dificultarán la evaluación y valoración del frotis sanguíneo. Para evitar esto hemos de filtrar y renovar estos colorantes según las necesidades laborales.

Para facilitar y acelerar la tinción de muestras hematológicas han surgido numerosos preparados comerciales basados en modificaciones de técnicas Romanowsky, como la tinción Diff-Quick® (Dade Behring Inc.). En general, la calidad obtenida con esta tinción es ligeramente inferior a la conseguida con tinciones puras de tipo Romanowsky, siendo su principal problema que los colorantes utilizados en esta y otras tinciones rápidas no tiñen adecuadamente los gránulos de los basófilos, células cebadas y linfocitos grandes granulares.

Además de las típicas derivadas del método Romanowsky, los frotis sanguíneos también pueden evaluarse con otra serie de tinciones específicas. Dado que el presente trabajo se centra en los equinos y, tal y como se ha citado anteriormente, en los mismos la respuesta regenerativa apenas conlleva el paso a circulación de reticulocitos, no detallaremos las distintas técnicas para la detección de los mismos (tinciones vitales basadas en el nuevo azul de metileno). Sí que es interesante conocer que los frotis sanguíneos, siguiendo la misma metodología ya descrita, también se pueden teñir con tinciones para la evaluación de depósitos de hierro (Azul de Prusia) o distintas técnicas citoquímicas para reconocimiento y estudio de los distintos tipos de leucocitos.

Para realizar el estudio de una extensión sanguínea hemos de realizar primero un rápido escaneado de la misma a pocos aumentos (100 aumentos, utilizando el objetivo de 10X), que nos permitirá determinar la zona de monocapa adecuada para evaluación, hacer una estimación rápida del número y concentración de leucocitos, determinar la presencia de agregados leucocitarios o plaquetarios, observar la presencia de macroparásitos (en el caso de equinos de escasa a nula importancia, pero sí más determinantes en especies como

los caninos), establecer la presencia de pilas de monedas o autoaglutinación y determinar si existe alguna zona con una densidad desproporcionada de células anómalas o específicas que pudiera falsear los resultados de un conteo diferencial manual (Walton, 2014). De forma general, en el denominado borde de la pluma de la extensión (en la zona más alejada del depósito inicial de la gota de sangre antes de realizar la extensión) es donde mayor concentración leucocitaria podremos encontrar y donde más se acumulan las células de mayor masa y volumen. En dicha zona también suelen concentrarse, si están presentes, los agregados plaquetarios.

El área óptima para la evaluación del frotis y para la realización de conteos celulares suele presentarse en la mitad del frotis más próxima al borde de la pluma del mismo. Esta área ha de presentar una monocapa abundante y una tinción adecuada con una densidad celular alta sin llegar a formarse una policapa (como regla general la mitad de los eritrocitos han de tocarse entre ellos sin llegar a solaparse).

Dado que anteriormente ya hemos realizado una recopilación de la apariencia normal de las principales poblaciones hemáticas en la sangre equina, nos centraremos a continuación en los principales hallazgos patológicos que pueden observarse a nivel del frotis sanguíneo.

3.1. Anomalías morfológicas eritrocitarias en el frotis sanguíneo.

Respecto a los glóbulos rojos, además de las citadas diferencias interespecíficas en la biconcavidad eritrocitaria -y por tanto en la apariencia del halo central-, existen importantes variaciones en el tamaño, forma, tendencia a formar rouleaux (o pilas de monedas) y tipo de respuesta regenerativa (características de los reticulocitos) entre los distintos mamíferos.

Los equinos se caracterizan por una respuesta regenerativa a cuadros de pérdida eritrocitaria sin apenas liberación de reticulocitos a circulación sistémica, incluso bajo condiciones de hematopoyesis acelerada, a diferencia de otras especies de interés veterinario. (Piccione *et al.*, 2008; Grondin *et al.*, 2010). En el caso de los equinos, el mayor indicador de respuesta regenerativa medular es la aparición a nivel circulante de los llamados policromatófilos, eritrocitos de un tamaño ligeramente mayor al normal y con una tinción más azulada debido a la menor compactación citosólica de los mismos

(Adili y Melizi, 2014). De forma más rara también se pueden ver otras alteraciones morfológicas que a veces se asocian con respuestas regenerativas (si bien en muchas ocasiones no se correlacionan con una respuesta medular, sino con un daño a nivel esplénico), como son los cuerpos de Howell-Jolly (Schalm y Carlson, 1982; Kramer, 2000; Grondin y Dewitt, 2010; Grondin *et al.*, 2010). Estos cuerpos representan remanentes nucleares de los ancestros medulares eritroides y suelen observarse como acúmulos basófilos en el citoplasma eritrocitario, normalmente en la periferia del mismo, siendo redondeados y únicos.

El eritrocito equino muestra una muy marcada tendencia a la formación de rouleaux, la cual probablemente se deba a la composición del glucocálix (Baumler *et al.*, 2001; Brockus *et al.*, 2003). Existe una correlación directa entre la formación de rouleaux y el ratio de sedimentación eritrocitaria. En determinados procesos patológicos asociados con hiperproteinemia -particularmente hiperglobulinemia o aumento del fibrinógeno plasmático- puede aparecer un incremento de la formación de pilas de moneda debido a la unión de dichas proteínas a la superficie eritrocitaria, que provoca una disminución de las cargas negativas en la membrana del glóbulo rojo que normalmente evitan la aposición de los eritrocitos (Schalm y Carlson, 1982; Brockus *et al.*, 2003).

La formación de estas pilas de moneda ha de ser distinguida de la autoaglutinación, que también puede observarse en el caballo y especies similares, y que suele aparecer por cuadros de anemia inmunomediada, intoxicaciones o tras el tratamiento con heparina no fraccionada. (Messer y Arnold, 1991; Reagan *et al.*, 1994; Feige *et al.*, 2003; Weiss y Moritz, 2003). Dicha aglutinación da lugar a la formación de grupos arracimados de eritrocitos en los que suele ser difícil o imposible delinear la membrana de cada célula de forma individual. Por su parte, los eritrocitos que conforman una pila de moneda o rouleaux no suelen conformar estas agrupaciones amorfas, sino columnas y filas ordenadas con una sola célula de grosor y mantienen de forma más o menos visible los límites definidos de sus membranas. Para diferenciar de forma más exacta entre ambos fenómenos, el clínico también puede realizar diluciones seriadas con suero salino (1:10), que provocarán en condiciones normales la disolución de los rouleaux, no así de los grupos de eritrocitos aglutinados (Ricketts *et al.*, 2006). La autoaglutinación en equinos no siempre va acompañada de hemólisis, observándose casos donde la misma se relaciona con la presencia de autoanticuerpos con máxima acción a bajas temperaturas (4-20°C)

(Monreal *et al.*, 1995). La autoaglutinación suele provocar problemas en los analizadores automáticos, interfiriendo con las determinaciones de MCV y con el RBC, mayormente en equipos que utilizan técnicas de impedancia (Grondin y Dewitt, 2010).

Al igual que en otras especies, en equinos pueden aparecer morfologías anómalas eritrocitarias en el frotis sanguíneo, siendo normalmente indicadoras de procesos patológicos. De forma genérica, el término poiquilocitosis se refiere a la presencia de una morfología variable en los eritrocitos circulantes. De forma más concreta, en la sangre de los equinos, las causas de poiquilocitosis suelen ser la presencia de cuerpos de Heinz, excentrocitos, esferocitos o equinocitos. (Messer y Arnold 1991; Geor *et al.*, 1993; Reagan *et al.*, 1994; Harvey *et al.*, 2003). Otras alteraciones morfológicas menos comunes en la sangre equina, como los queratocitos, acantocitos, ovalocitos y esquistocitos han sido asociados a anemias ferropénicas en potros (Fleming *et al.*, 2006).

A continuación describiremos brevemente algunas características de aquellos que se puede observar con cierta frecuencia:

➤ Los cuerpos de Heinz son pequeñas evaginaciones redondeadas que aparecen en la membrana eritrocitaria y que suelen teñirse de color azulado con tinciones vitales como el nuevo azul de metileno. Son el resultado de la denaturalización y precipitación por acción oxidativa de la globina de los eritrocitos (Harvey, 2006). Estos agregados citoplasmáticos aumentan la debilidad eritrocitaria y en el caso de equinos se han observado crisis de anemia hemolítica asociada a cuerpos de Heinz en intoxicaciones por cobre, ingesta de derivados de la cebolla, sobredosificación con fenotiacina o infección con virus de anemia infecciosa equina (McGuire *et al.*, 1970; Reagan *et al.*, 1994; Ankringa *et al.*, 2012). En un estudio de hemólisis provocada mediante administración de fenotiacina, estas anomalías morfológicas fueron detectadas hasta por 2 meses tras dicha administración (Radin *et al.*, 1986).

➤ Los excentrocitos son eritrocitos que muestran dos zonas citoplasmáticas claramente diferenciadas: una región oscura y densa donde se acumula toda la hemoglobina y otra zona semilunar periférica de color claro. Suelen aparecer a consecuencia de daños oxidativos en la membrana eritrocitaria que provocan cambios conformacionales en la misma (Harvey, 2006). En equinos los excentrocitos suelen

considerarse signo de un elevado daño oxidativo y se han observado en cuadros de intoxicación o déficits específicos enzimáticos eritrocitarios que transforman al glóbulo rojo en altamente sensible al ataque de productos oxidantes (Reagan *et al.*, 1994; Stockham *et al.*, 1994; Harvey *et al.*, 2003).

➤ Los esferocitos son eritrocitos de tamaño inferior al normal que se suelen identificar en otras especies por su típica carencia de palidez central. En el caso de los equinos la identificación de esta anomalía eritrocitaria es difícil, dada la ausencia de dicha zona central. De forma rutinaria, los esferocitos se suelen identificar por su tamaño ligeramente inferior al de un eritrocito normal y su citoplasma altamente condensado con tinción intensa y oscura. Estas células aparecen debido a la fagocitosis macrofágica de regiones de la membrana eritroide que han sido opsonizadas por inmunoglobulinas o factores del complemento. La presencia de un elevado porcentaje de esferocitos suele ser indicativa de un cuadro de anemia inmunomediada hemolítica. Estos procesos se han identificado en caballos con anemia infecciosa equina (Messer y Arnold 1991; Riegel y Stockham, 2010).

➤ Los equinocitos son una de las alteraciones morfológicas más comúnmente observadas en el frotis equino, si bien su importancia diagnóstica es escasa. Se caracterizan por presentar numerosas espículas en su membrana repartidas de forma uniforme a lo largo de su periferia y de un tamaño escaso. Normalmente los equinocitos representan un hallazgo artefactual en el frotis sanguíneo equino (denominándose entonces crenocitos o eritrocitos crenados), y se suelen asociar con el secado lento de la muestra o un llenado inadecuado del tubo de hematología. También es común observar equinocitosis debido a un envejecimiento marcado de la muestra o por un almacenaje erróneo de la misma que provoque una depleción en los niveles de ATP eritrocitario (Weiser *et al.*, 1983). No obstante, estas alteraciones también pueden aparecer por patologías que provoquen desórdenes en la membrana eritroidea. En equinos se ha descrito la aparición de equinocitosis asociada a cuadros de hiponatremia debido a distintas patologías o a administración de diuréticos (Weiss *et al.*, 1992; Geor *et al.*, 1993).

➤ Los esquistocitos son fragmentos de membrana eritroide resultantes del daño mecánico a los glóbulos rojos al pasar por capilares alterados. Suelen presentar

formas triangulares, en coma o irregulares. Se suelen presentar de forma concurrente a cuadros de coagulación intravascular diseminada (CID) debido a la aparición de numerosos microtrombos en capilares sanguíneos o bien en patologías como la vasculitis. De forma secundaria, también se han observado numerosos esquistocitos en cuadros de anemia ferropénica en potros, probablemente debido a la mayor fragilidad de los glóbulos rojos en este proceso (Fleming *et al.*, 2006).

➤ Los queratinocitos también aparecen por daños de fragmentación en el glóbulo rojo. Estos eritrocitos presentan una vesícula o vacuola en la periferia de la membrana que posteriormente se rompe, dando lugar a una célula con forma de media luna con dos proyecciones en forma de cuerno -de ahí su nombre-. Al igual que los esquistocitos, los queratinocitos se relacionan en equinos con cuadros ferropénicos, microangiopatías como el CID o la vasculitis, etc. (Fleming *et al.*, 2006).

➤ Los acantocitos son eritrocitos de forma irregular que muestran varias proyecciones asimétricas, comúnmente de mayor tamaño a las que muestra el equinocito. En humana los acantocitos suelen aparecer por alteraciones en la composición lipídica de la membrana eritroide, como las que suceden en hepatopatías. En veterinaria aún se desconoce el origen de estas células, si bien se han observado en lipidosis hepática felina y en hemangiosarcomas caninos. Los acantocitos son muy raramente observados en equinos (Fleming *et al.*, 2006).

3.2. Anomalías morfológicas leucocitarias en el frotis sanguíneo.

Respecto a los leucocitos, y en especial los neutrófilos, la alteración morfológica más característica en equinos son los denominados cambios tóxicos. Estos cambios aparecen por una mielopoyesis exacerbada y acelerada a nivel medular, como la que se produce en respuesta a cuadros inflamatorios o infecciosos severos (Grondin y Dewitt, 2010). Debido a esta sobreproducción medular, tanto los neutrófilos maduros como los bandados, e incluso otros precursores como los metamielocitos, aumentan la cantidad de organelas a nivel citoplasmático, dando lugar a cambios tintoriales en su aspecto en el frotis sanguíneo. A pesar de estos cambios morfológicos las células tienen una funcionalidad normal. Entre los principales cambios tóxicos que se han descrito en equinos cabrían destacar los siguientes: basofilia citoplasmática, aparición de agregados citoplasmáticos característicos denominados cuerpos de Döhle, vacuolización del

citoplasma, aumento del tamaño -apareciendo los denominados neutrófilos gigantes-, etc. En equinos, los cuerpos de Döhle se observan frecuentemente en cuadros inflamatorios y por tanto no han de ser considerados signos de toxicidad severa (al contrario que en otras especies). La granulación tóxica neutrofilica también se suele observar frecuentemente en leucogramas tóxicos equinos, siendo dichos gránulos de tamaño pequeño, color purpúreo y muy numerosos. En general se considera que estos corpúsculos son gránulos primarios muy evidentes (Grondin y Dewitt, 2010).

En el citoplasma de los neutrófilos equinos se puede observar también raramente parásitos como *Anaplasma phagocytophilum* (anteriormente clasificado como *Ehrlichia equi*).

4. Contajes celulares manuales.

El número total de leucocitos, eritrocitos y plaquetas se puede obtener tanto de forma manual como mediante analizadores automáticos. El recuento manual es una técnica que requiere personal cualificado y en la que se invierte gran cantidad de tiempo. Además, incluso realizándose con las mejores especificaciones metodológicas tiene un coeficiente de variación muy amplio (10% a 22%) (Cartwright, 1973), por lo cual esta tecnología prácticamente ha desaparecido de muchos laboratorios clínicos al ser reemplazada por los contadores de células o autoanalizadores de hematología. Existen, no obstante, métodos más modernos basados en el contaje y el uso de pipetas especiales (Unopette®), que también se comentarán a continuación.

Para hacer el recuento de eritrocitos por método manual se requiere pipeta de dilución para glóbulos rojos y plaquetas (pipeta de Thoma), una cámara de Neubauer (o hemocitómetro) y un microscopio (Fajardo y Guerrero, 1975; Perkins, 2004). Para llevar a cabo el contaje, una vez obtenida la muestra de sangre y conservada en un tubo con EDTA, hay que llenar la pipeta de glóbulos rojos con sangre hasta la marca 0,5 para realizar una dilución de 1/200 (si se carga hasta 1, la dilución será 1/100). A continuación, se absorbe solución de Hayem (mezcla de sulfato de sodio, cloruro sódico, cloruro mercuríco y agua destilada) hasta completar el llenado de la pipeta y se homogeniza la muestra. Por último, se descartan las primeras gotas de la muestra, depositando las

siguientes gotas sobre la cámara de Neubauer hasta que por capilaridad se llene. Tras dejar reposar la dilución 2 minutos para que las células sedimenten, se procede a realizar el recuento de eritrocitos. Una vez realizado dicho conteo únicamente hemos de multiplicar el resultado por la dilución realizada, teniendo en cuenta el área de conteo que hemos analizado. Por ejemplo, en las cámaras de Neubauer típicas para hematología existe un cuadrado de 1 mm^2 de superficie central, el cual está dividido en 25 secciones cuadradas con subdivisiones a su vez. En cada una de estas secciones se han de contar los elementos celulares (sean los que sean) que aparezcan en su interior o bien que contacten con los bordes superior y derecho. Al seguir esta dinámica se evita el conteo repetido de elementos formes. Puesto que la profundidad de la cámara es de $0,1 \text{ mm}$, el área analizada si contamos todo el cuadro central es de $0,1 \text{ mm}^3$, es decir, $0,1 \text{ }\mu\text{L}$. En el caso de los glóbulos rojos, el conteo obtenido en toda el área habría de multiplicarse por 2000 si llegamos a la marca 0,5 y por 1000 si llegamos a la marca 1, obteniéndose finalmente el número de eritrocitos por microlitro.

En el caso del recuento de leucocitos por método manual se requiere pipeta de dilución para glóbulos blancos, una cámara de Neubauer y un microscopio (Fajardo y Guerrero, 1975; Perkins, 2004). Para llevar a cabo el conteo, una vez obtenida la muestra de sangre y conservada en un tubo con EDTA como anticoagulante, hay que llenar la pipeta de glóbulos blancos con sangre hasta la marca 0,5 para realizar una dilución de $1/20$. A continuación se absorbe solución de Turk (mezcla de ácido acético glacial, violeta de genciana y agua destilada que, al ser hipotónica, permite la eritrolisis) hasta completar el llenado de la pipeta y se homogeniza la muestra. Por último, se descartan las primeras gotas de la muestra, depositando las siguientes gotas sobre la cámara de Neubauer hasta que por capilaridad se llene. Tras dejar reposar la dilución 2 minutos para que las células sedimenten, se procede a realizar el recuento de leucocitos. El resultado final habrá de tener en cuenta la superficie que se ha contado y la dilución realizada (en este caso $1/20$).

Por último, el conteo manual de plaquetas se suele realizar sobre sangre almacenada en citrato sódico, evitándose así la formación de agregados plaquetarios. Inicialmente se realiza una dilución $1/100$ de la sangre en oxalato cálcico, el cual ayuda a evitar que las plaquetas se agreguen, separándolas para poder realizar un buen conteo. Este producto también es capaz de lisar todos los eritrocitos y leucocitos, dejando intactas las plaquetas que, por tanto, son más fácilmente evaluables y enumerables. Tras 10

minutos de reposo en horizontal, se ha de cargar la cámara de Neubauer, cubierta previamente con un cubreobjetos e incubarla en una cámara húmeda (que puede construirse fácilmente con una placa de Petri con un papel de filtro húmedo en su interior) durante 10 minutos más. Esta incubación permite que las plaquetas aparezcan en un solo plano, mostrando una refringencia muy característica que ayuda a su reconocimiento. Finalmente, para obtener el número de plaquetas por microlitro, habríamos de multiplicar el resultado considerando la superficie enumerada y la dilución que hemos utilizado.

En la actualidad, dados los problemas que suele presentar el método tradicional de contaje manual para obtener resultados fiables (mayormente debido a la baja exactitud de las diluciones realizadas con la pipeta de Thoma, la ausencia de una correcta mezcla de las células con el diluyente en la misma y la posterior distribución escasamente homogénea de las células en la cámara de contaje), se han desarrollado nuevos instrumentos que permiten mejorar esta técnica. De entre los mismos se debería resaltar el método de contaje manual utilizando el sistema Unopette (Bector Dickinson). Existen Unopette específicas para cada elemento forme (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) sanguíneo, siendo las mismas desechables (lo cual aumenta la seguridad del método, sobre todo en medicina humana). Cada sistema Unopette está constituido por un reservorio sellado que contiene una cantidad preestablecida de diluyente y por una pipeta capilar calibrada independiente que tiene una muesca en su base para perforar el reservorio del diluyente. Este sistema permite una mezcla de la muestra mucho más homogénea y una dilución mucho más exacta de la misma. Tras realizar la dilución, la muestra se posiciona en un hemocitómetro y se procede al contaje de las células siguiendo la metodología ya descrita (Gerarde, 1965).

5. Fórmula diferencial leucocitaria.

En la actualidad, en hematología veterinaria, esta técnica se considera el *gold standard* para conocer los porcentajes de subpoblaciones leucocitarias presentes en un paciente. No obstante, la misma presenta numerosas limitaciones y hemos de ser conscientes de las mismas. Estas fórmulas diferenciales leucocitarias pueden servirnos también para la comprobación de los resultados de analizadores automáticos (Stirn *et al.*, 2014).

En un reciente estudio en el que se valoraron las causas de revisión manual (tanto realización de contajes diferenciales manuales como revisión óptica de frotis sanguíneo) de más de 2.000 muestras hematológicas equinas analizadas mediante tecnología de láser, hasta el 20% de las muestras equinas tuvieron que ser evaluadas por un patólogo a petición de los clínicos. La principal causa para dicha evaluación fue la sospecha de una desviación a la izquierda (17% total de las muestras), seguida por la ausencia de separación correcta de las poblaciones leucocitarias en los histogramas proporcionados por el equipo (10%) y la sospecha de la presencia de linfocitos reactivos (2%) o poblaciones blásticas circulantes. Interesantemente, se observó que el 30% de las muestras marcadas como desviación a la izquierda en caballos por el analizador realmente se correspondían a falsas alarmas, siendo el caballo la especie donde mayor sensibilidad (97%) pero menor especificidad (18%) mostraba la detección de desviación a la izquierda por parte del analizador (Stirn *et al.*, 2014).

A la hora de realizar contajes diferenciales leucocitarios hemos de ser conscientes de su escasa repetitividad y representatividad. Para aumentar estos parámetros hemos de aumentar el número total de células contadas y ampliar la zona de contaje todo lo posible. De forma previa también es importante el escaneo inicial de la muestra para asegurarnos que vamos a realizar dicho contaje en una región representativa del total de la muestra examinada (Durand y Dzierzak, 2005). Los leucocitos tienden a romperse y a alargarse en el borde de las muestras, más aún si el hematocrito de las mismas es elevado. En general los contajes diferenciales han de realizarse con objetivos de 40 aumentos (400 magnificaciones en total) sobre un total de 200 células como mínimo. Dado que los monocitos y otras células de gran volumen y masa suelen concentrarse en los bordes de la muestra, el contaje diferencial ha de seguir un patrón denominado en criss-cross evitando la evaluación repetida de la misma zona del frotis.

Los glóbulos rojos nucleados (nRBC), en caso de presentarse, han de tabularse de forma independiente en el contaje manual. Este valor es importante cuando se realizan contajes manuales o se utilizan analizadores automáticos con sistemas de impedancia, pues los mismos suelen considerar los eritrocitos nucleados como leucocitos (Harvey, 2012). Es por ello por lo que se aconseja que, si los eritrocitos nucleados superan el 5% del contaje realizado, se proceda a corregir el número total de leucocitos obtenidos por el analizador con la siguiente fórmula:

$$WBC_{real} = \frac{WBC_{contado} \times 100}{100 + \%nRBC}$$

Cuando se realiza el conteo diferencial también deberíamos enumerar las denominadas *smudge cells*. Éstas se identifican en el frotis como células con la membrana nuclear rota y el citoplasma comúnmente también desecho, por lo cual su reconocimiento es imposible. Cuando en un conteo diferencial las *smudge cells* corresponden al 10% o más, deberíamos volver a repetir el frotis sanguíneo y el conteo diferencial. Entre las causas de un aumento de dichas células se pueden citar el envejecimiento de la muestra, la inadecuada conservación de la misma, un método inadecuado en la realización del frotis sanguíneo o la presencia intrínseca de células anómalas en sangre con marcada fragilidad y que, por tanto, se destruyen rápidamente aun cuando la muestra se conserve y prepare adecuadamente (Harvey, 2012). Un ejemplo de células frágiles, que suelen provocar conteos con elevados porcentajes de *smudge cells*, son las células leucémicas.

También deberíamos mencionar que existen fórmulas para el cálculo aproximado de la concentración leucocitaria y plaquetaria de un paciente basándose en el examen del frotis sanguíneo. Así pues, utilizando un objetivo de 10 aumentos (es decir, 100 aumentos en total), el número medio de leucocitos por campo observados puede multiplicarse por 100 a 150 para obtener una estimación del número de leucocitos por microlitro en la muestra (Harvey, 2012). Este factor de multiplicación varía no obstante según el microscopio utilizado y la técnica de extensión realizada en el frotis, por lo que se aconseja adaptarlo a cada laboratorio y situación específica.

En ciertas especies, como la felina o los equinos, se han desarrollado fórmulas para el cálculo aproximado de la concentración plaquetaria basadas en el número de plaquetas presentes en un frotis teñido (Gimble *et al.*, 1996). No obstante, dicha metodología no está descrita en otras especies e igualmente muestra unos márgenes de error poco asimilables para una adecuada valoración clínica de los pacientes. En la mayoría de especies domésticas, un paciente sano presenta una media de 10 a 30 plaquetas por campo de bajos aumentos evaluado, si bien dicho número puede llegar a bajar hasta a 6 plaquetas por campo de bajos aumentos en caballos (Kaushansky, 2008). El número total de plaquetas de la muestra se puede estimar también multiplicando el número medio de plaquetas por campo de bajo aumentos por 15.000 o 20.000 (Kaushansky, 2008; Kalinkovich *et al.*, 2009)

6. Determinación de la hemoglobina.

Para determinar la hemoglobina por método manual se requiere la pipeta de Sahli, solución de Drabkin y un espectrómetro que permita medir los cambios de color que se presentan tras la reacción bioquímica (International Committee for Standardization in Haematology, 1987). En el método estandarizado por este comité, se lisan los glóbulos rojos y se oxida el hierro de la hemoglobina de ferroso a férrico (Fe^{2+} a Fe^{3+}), pasando la misma a su forma de metahemoglobina. Más tarde se combina con cianuro de potasio para formar cianometahemoglobina, la cual es un compuesto muy estable cuya absorbancia puede ser determinada a 546 nm. Dicha absorbancia es directamente proporcional a la concentración inicial de hemoglobina en la muestra. Esta misma metodología se puede realizar con un sistema Unopette específico. Igualmente, la mayoría de analizadores hematológicos de veterinaria (no así los de humana o los equipos de alta gama como el Advia 120) también determinan la hemoglobina siguiendo este mismo método.

En la actualidad también existen diversos hemoglobinómetros de mano o medidores portátiles que han facilitado este protocolo, siendo posible el uso de los mismos por veterinarios en el campo o a pie de cuadra. Si bien inicialmente estos hemoglobinómetros se basaban en técnicas subjetivas y poco fiables, como la comparación de la absorción de luz verde de la muestra tras hemólisis con un patrón prefabricado (utilizado por el equipo HbMeter de Leica); han aparecido nuevos equipos más sensibles que transforman la hemoglobina en azidometahemoglobina y determinan la absorbancia tanto a 565 como 880 nm (HemoCue) (Knoll y Rowell, 1996).

Muy recientemente, debido a la preocupación medioambiental y los riesgos laborales que el uso de los reactivos para medición de Hb podrían conllevar (nótese la utilización de cianuro de potasio), se han desarrollado nuevas técnicas espectrofotométricas para la detección de la misma mediante la creación de oxihemoglobina y su medición a 555 nm (Wassmuth *et al.*, 2011), entre otras variaciones.

7. Examen de médula ósea.

Esta técnica se suele reservar para casos de leucopenia, anemia o trombocitopenia persistente, así como cuando existe una sospecha de neoplasia hematológica (Delling *et al.*, 2012). Dado que los detalles del examen citológico e histológico de la médula ósea quedan fuera del ámbito de la presente tesis, no se entrará en detalle sobre las especificaciones del mismo en caballos.

8. Analizadores automáticos.

Los analizadores automáticos de hematología utilizan varias tecnologías para la detección del número y tamaño de los elementos formes circulantes. En la actualidad, la mayoría de laboratorios de referencia en hospitales clínicos veterinarios y muchos laboratorios de clínicas de pequeño y mediano tamaño confían en los resultados de estos analizadores, aceptándose los mismos como aquellos que proporcionan mayor fiabilidad para el estudio hematológico de los pacientes. Si bien siempre debemos realizar controles y calibraciones específicas en estos equipos y los mismos presentan numerosas limitaciones que detallaremos más adelante, ciertamente el uso de estos equipos permite realizar de forma rápida, asequible y fiable análisis hematológicos completos en el ambiente clínico veterinario.

En general, con los analizadores automáticos, se pueden obtener los siguientes parámetros hematológicos:

- **Recuento Eritrocitario**, normalmente utilizándose como unidad $10^6/\mu\text{L}$.
- **Hematocrito calculado**. Se obtiene normalmente al multiplicar el MCV por RBC. Se expresa en %.
- **Hemoglobina**. Se determina por espectrofotometría, tal y como se ha comentado anteriormente. De forma general, en todos los mamíferos salvo los camélidos, la hemoglobina suele representar un tercio del valor del hematocrito (un tercio del volumen del eritrocito se corresponde a hemoglobina).
- **Volumen Corpuscular Medio**. Tamaño medio de los eritrocitos, directamente analizado por el equipo. Conviene recordar que el MCV medio del caballo sano suele variar entre 40 y 52 fL (Lassen y Swardson, 1995; Kramer, 2000;

Grondin y Dewitt, 2010), mostrando divergencias según la raza, edad, etc. El MCV para burros obtenido en distintos estudios se puede consultar en Tabla 1 y, tal y como se ha comentado, suele variar entre 55,6-57,9 fL, mostrando cambios según el sexo y la edad. Lo más interesante de este parámetro, en el caso de los equinos, es su uso (junto con RDW) para la evaluación del grado de regeneración en cuadros anémicos.

De forma manual también se puede calcular, siendo el resultado de la relación del hematocrito por centrifugación y del recuento manual de eritrocitos, mediante la aplicación de la siguiente fórmula (Campuzano-Maya, 1995):

$$\text{Volumen corpuscular medio (fL)} = (\text{hematocrito} \div \text{recuento de eritrocitos en millones por } \mu\text{L}) \times 10$$

- **Hemoglobina corpuscular Media.** Cantidad de hemoglobina media por eritrocito. De forma general, este parámetro suele carecer de interés clínico y es difícil de interpretar. Es un parámetro calculado en los analizadores automáticos, obteniéndose mediante la fórmula que relaciona la hemoglobina con el recuento de eritrocitos, aplicando la siguiente fórmula.

$$\text{Hemoglobina corpuscular media (pg)} = (\text{hemoglobina en g/dL} \div \text{recuento de eritrocitos en millones por } \mu\text{L}) \times 10$$

- **Concentración media de hemoglobina corpuscular.** Cantidad de hemoglobina relativa al tamaño de la célula o, dicho de otra forma, nos indica la concentración de hemoglobina en la masa eritroide. Dado que la hemoglobina suele tener una relación casi fija con el hematocrito en todos los mamíferos excepto camélidos (1/3), el valor de MCHC suele tener un rango en mamíferos entre 33 y 38 g/dL. En camélidos, la mayor cantidad de hemoglobina dentro de sus eritrocitos puede elevar este parámetro hasta 45 g/dL (Weiser, 2012). Este valor, si bien no muy importante clínicamente, sí que es muy interesante desde el punto de vista laboratorial, ya que nos permite determinar el rendimiento del equipo automático.

El hematocrito y la hemoglobina se suelen calcular en dos alícuotas distintas en estos equipos (en la de rojos y en la de blancos, respectivamente), las cuales sufren distintas diluciones y siguen un camino divergente dentro del esquema mecánico del analizador. Un fallo en alguno de esos subsistemas provocará una

alteración en solamente uno de esos parámetros, por lo que la MCHC saldrá del rango previsto (Weiser, 2012). También se ha de tener en consideración que cualquier cuadro que eleve la hemoglobinemia (hemoglobina libre en plasma), como la hemólisis *in vivo* o artefactual, podrá elevar la MCHC. Clínicamente este parámetro también puede servir para detectar la presencia de reticulocitos (en especies que los liberen), ya que los mismos presentan un elevado volumen (mayor HCT) pero poca Hb (aún la están sintetizando), dando lugar a una caída en MCHC. Sin embargo, cuadros de anemia ferropénica también pueden dar lugar a caídas en la MCHC. Este parámetro se obtiene aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de la hemoglobina corpuscular media (g/dL)} = (\text{hemoglobina en g/dL} \div \text{hematocrito}) \times 100$$

- **Amplitud de distribución eritrocitaria.** Se calcula como el cociente entre el coeficiente de variación de la distribución de los volúmenes de los eritrocitos dividido por el volumen corpuscular medio (MCV), expresado en tanto por ciento. Matemáticamente se calcula con la fórmula siguiente:

$$RDW = (\text{desviación estándar del MCV} \div \text{media del MCV}) \times 100.$$

- **8.-Contaje total de leucocitos (WBC),** expresado como número en $10^3/\mu\text{L}$. A su vez de las distintas subpoblaciones leucocitarias (linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos y neutrófilos) se obtienen tanto su porcentaje (%), como el número total ($10^3/\mu\text{L}$).

- **9.-Contaje total de plaquetas.**

- **10.-Volumen medio plaquetario.** Se obtiene usualmente de forma directa.

- **11.-Amplitud de distribución trombocitaria.** Se calcula de forma similar al RDW.

- **12.-Plaquetocrito.** Es un parámetro calculado de forma similar al HCT.

- **13.- Otros parámetros específicos de ciertos analizadores** (MPC, PCDW, etc.).

En la actualidad existen en medicina veterinaria tres tipos de analizadores hemáticos automáticos: aquellos basados en la centrifugación de la muestra (también denominados analizadores cuantitativos del *buffy coat*), los que obtienen sus resultados en base al principio de Coulter (impedancia) y los analizadores basados en el principio de dispersión de la luz por parte de las células circulantes (tecnologías de tipo láser y similares). Tanto los equipos de impedancia como los basados en dispersión de la luz utilizan técnicas espectrofotométricas para la determinación de la concentración de hemoglobina de la muestra. Pasaremos a continuación a detallar las técnicas, ventajas e inconvenientes de cada uno de estos tipos de equipos.

8.1. Analizadores basados en el estudio del buffy coat.

Esta tecnología separa los subtipos celulares según su densidad. Las células no son realmente contadas y enumeradas, sino que se determina la variación en el grosor de las distintas capas generadas en el *buffy coat* tras centrifugación (Knoll y Rowell, 1996). En la actualidad, únicamente existe un equipo a la venta para medicina veterinaria basado en esta técnica, el denominado QBC (Quantitative Buffy Coat) VetAutoread de Idexx. Este equipo, además de diferenciar las células basándose en las capas formadas por las mismas dada su distinta densidad, también utiliza fluorocromos (naranja de acridina) que tiñen las lipoproteínas, el ADN y el ARN, ayudando a distinguir los distintos subtipos celulares (Denicola, 2011). Igualmente, con la ayuda de un separador específico, se amplían y dividen más exactamente las distintas capas que se forman tras la centrifugación.

El equipo genera una gráfica donde se separan las distintas subpoblaciones celulares según su densidad y su localización en el *buffy coat*. Dado que las plaquetas son los elementos formes de menor densidad, las mismas ocupan la zona más superior de la *buffy coat*, seguidas por los linfocitos y monocitos y después los granulocitos (Denicola, 2011). Sobre la *buffy coat* se suele localizar el plasma y bajo la misma los eritrocitos. Los reticulocitos y otras células eritroides inmaduras se hallan en la interfase entre los eritrocitos y los granulocitos.

Dado que este equipo no determina directamente los tamaños celulares, los contajes de las distintas poblaciones son estimaciones basadas en el tamaño de cada una de las capas formadas (Knoll y Rowell, 1996). Al presuponer un tamaño celular promedio y no identificar cuadros donde el tamaño de las distintas células varía, son comunes y significativos los fallos a la hora de realizar los contajes (Denicola, 2011; El Ouriaghli *et al.*, 2003). Este equipo permite detectar con cierta eficacia estas poblaciones en muestras normales y también tiene un adecuado rendimiento para identificar cuadros de leucocitosis, la presencia de microfilarias o reticulocitos. No obstante, se han observado ciertos problemas a la hora de reconocer los eosinófilos en algunas especies como los perros y las correlaciones obtenidas con otros equipos respecto a los contajes absolutos reticulocitarios han sido pobres (Denicola, 2011).

Una de las mayores ventajas de este tipo de equipos es su bajo coste y rapidez a la hora de obtener un resultado (unos 7 minutos). Esta tecnología suele presentar buenos resultados en la evaluación de pacientes veterinarios sanos, con adecuadas correlaciones con los métodos de referencia (Levine *et al.*, 1986; Brown y Barsanti, 1988; Guelfi y Trummel, 1995; Bienzle *et al.*, 2000). También habría que considerar que, debido a la metodología utilizada, este equipo devuelve el resultado del PCV (no el hematocrito calculado). Como principales inconvenientes de este tipo de equipos destacan su incapacidad para detectar la presencia de neutrófilos bandados y el cálculo indirecto (y de baja fiabilidad) de la hemoglobina del paciente (Denicola, 2011).

En el resto de equipos (impedancia y láser) la muestra no es centrifugada. En su lugar se suele tomar una alícuota de la misma mediante aspiración con una jeringa y válvula específica y se divide en dos porciones. En una de estas fracciones se suelen obtener los parámetros leucocitarios, realizándose de forma previa una dilución 1:40 con un reactivo capaz de lisar los eritrocitos (normalmente un aditivo derivado del amonio cuaternario). Esta porción también se suele utilizar para la determinación de la concentración de hemoglobina (tras eritrolisis). La segunda porción se usa para la determinación de parámetros eritroides y plaquetarios, realizándose de forma previa una dilución 1:50.000 en una solución isotónica.

8.2. *Sistemas de impedancia.*

Los analizadores basados en la tecnología de impedancia tienen su fundamento en el denominado principio de Coulter. Este principio determina que las células son conductoras relativamente pobres de la electricidad al estar disueltas en una solución electrolítica (Harvey, 2012). En estos analizadores normalmente existen dos electrodos a ambos lados de una pequeña apertura, que es por la cual se introducen las células de forma individual. Los cambios de voltaje que aparecen cada vez que una célula atraviesa dicha apertura son registrados por el equipo, siendo los mismos directamente proporcionales al volumen de dicha célula (Denicola, 2011). El número total de células se obtiene analizando el número de cambios en el voltaje registrados. Este sistema permite diferenciar entre eritrocitos y plaquetas en muchas especies, únicamente basándose en el tamaño. No obstante, en otras especies como los felinos, el tamaño de ambas poblaciones presenta un amplio solapamiento y, por tanto, se pueden observar numerosos fallos en equipos de impedancia (Weiser *et al.*, 2007). En estos equipos se suelen establecer rangos especie-específicos que permiten determinar más exactamente qué tipo de célula es la que ha atravesado la apertura e ignorar detritus celulares.

De forma previa a las determinaciones, como en el resto de analizadores, el equipo realiza una serie de diluciones de la muestra a partir de las cuales calcula las concentraciones finales de cada subpoblación. A nivel leucocitario este tipo de analizadores proporciona con frecuencia un diferencial en tres subpoblaciones: linfocitos, monocitos y granulocitos (incluyéndose neutrófilos, eosinófilos y basófilos) (Dewhurst *et al.*, 2003). Estas subpoblaciones se reconocen en base al tamaño nuclear, el cual se suele determinar tras lisar el citoplasma con una serie de reactivos específicos. Este tipo de técnica presenta el problema de incluir a los eritrocitos nucleados (sobre todo las formas más inmaduras) dentro del conteo leucocitario (normalmente como linfocitos). De igual forma, estos analizadores requieren que las distintas subpoblaciones leucocitarias presenten tamaños claramente distintos entre sí, mostrando ciertos problemas en la clasificación leucocitaria si existen variaciones en el tamaño típico de alguna población (Tvedten *et al.*, 2000). Si bien este tipo de analizadores aún está bastante presente en muchas clínicas veterinarias de pequeño tamaño, en la actualidad han caído en desuso dada la mayor exactitud, precisión, prestaciones y precio más competitivo de los equipos hematológicos basados en técnicas láser. Otro problema de este tipo de analizadores es su incapacidad, en general, de detectar la presencia de reticulocitos.

Algunos ejemplos de equipos comerciales basados en técnicas de impedancia son los siguientes: serie F de Sysmex, pocH-100iV de Sysmex, Mythic 18 de Orphée, serie VetScan de Abaxis, Vet ABC de Scil, CBC-Diff de Heska, analizador AcT de Beckman Coulter, MS45 (Melet Schloesing Pharmaceuticals), HemaVet 950 y anteriores de Drew Scientific, etc.

8.3. Analizadores basados en técnicas de radiofrecuencia.

Este método suele utilizarse en equipos específicos para complementar al de impedancia. En él se genera una corriente electromagnética alterna que penetra en la membrana celular a su paso por la hendidura. La amplitud del pulso resultante depende de la complejidad del interior celular, dando más información relativa a los componentes internos de las células incluyendo el tamaño y densidad nuclear (Kang *et al.*, 2008).

8.4. Analizadores hematológicos basados en técnicas laser.

Esta tecnología es más reciente que las anteriores y permite un estudio más detallado de cada célula sanguínea. Ya en el año 1896 George Oliver y colaboradores basaron el conteo de células sanguíneas en la medición (a ojo) de la pérdida de la luz causada por la dispersión y la absorción en una prueba en la que se usaba sangre diluida, proporcionando el primer recuento de glóbulos rojos sin necesidad de realizar un recuento individual y manual de las células, siendo éste el precursor de los métodos automáticos actuales. Sin embargo, la incapacidad para cuantificar con precisión la pérdida de luz, así como los problemas relacionados con las variaciones en el tamaño y la forma celular o la concentración de hemoglobina impidió el progreso de este método. En las décadas sucesivas este sistema ha ido perfeccionándose por numerosos científicos desarrollando diferentes fotodetectores (Marcandier *et al.*, 1929) y sistemas de flujo laser (Dittrich *et al.*, 1968) que han dado lugar a los analizadores actuales.

Estos analizadores de flujo laser analizan la dispersión de la luz producida por las células hemáticas a su paso por un láser, registrando el número de veces que el láser se interrumpe, proporcionando así el recuento celular. Por otro lado, la cantidad y el ángulo de dispersión se utilizan para clasificar a las diferentes células por tamaño, forma,

características del núcleo, granularidad del citoplasma y su índice de refracción (Denicola, 2011). El grado de absorción sirve para determinar el tamaño celular y la dispersión provee información acerca de la densidad y complejidad interna de la célula. Estos equipos también permiten la determinación automática del número de reticulocitos y, en ciertos casos, plaquetas reticuladas o inmaduras (Erslev y Beutler, 1995), así como el cálculo de parámetros eritrocitarios específicos según la concentración de hemoglobina individual de cada célula (Beorge *et al.*, 1999). La base para el reconocimiento de reticulocitos y distintas subpoblaciones plaquetarias por parte de algunos de estos analizadores es el uso de fluorocromos específicos como el yoduro de propidio o el polimetina, los cuales son afines a las cadenas de ADN y ARN y permiten su reconocimiento al interactuar con el láser. La base técnica y científica de estos analizadores es la citometría de flujo.

La citometría de flujo es una técnica que puede utilizarse para identificar las propiedades físicas y funcionales de las células presentes en una suspensión líquida, ya sea la misma sangre, un fluido o un medio específico. Para el estudio celular mediante esta técnica se crea un flujo de fluido que va siendo analizado mediante un láser capaz de evaluar varias características celulares (Weiss, 2002). Los citómetros de flujo con un solo haz de láser normalmente contienen gas argón que emite luz a una longitud de 488 nm. No obstante, esta longitud de onda es variable entre equipos y ciertos analizadores utilizan longitudes del rango 600-630 nm. La difracción y desviación que sufre la luz de dicho haz al ser atravesada por una célula permite conocer tanto el tamaño de la misma como su complejidad interna (granularidad). Así, por ejemplo, la pérdida de la luz hacia adelante, es decir, hacia el receptor o fotodiodo colocado justo enfrente del haz emisor, en un ángulo de 0° (*forward direction scattering* o FSC), es directamente proporcional al tamaño o volumen celular. La luz que sufre una difracción en ángulo de 90 grados (difracción ortogonal, *side scattering* o SCC) también es detectada por varios receptores (tubo fotomultiplicador) colocados en los laterales del flujo y la misma es directamente proporcional a la granularidad de la célula (Davis *et al.*, 2002). Por último, la difracción o dispersión lateral en un ángulo de 10 grados también se puede analizar para estudiar la composición del citoplasma y núcleo celular. En base a estos parámetros, la mayoría de las células sanguíneas circulantes pueden clasificarse en distintos grupos o clústeres que permiten su diferenciación. Los citómetros de flujo más avanzados poseen, además del fotodiodo y el tubo fotomultiplicador mentados, otros tres tubos que permiten el

reconocimiento de la luz fluorescente de distinto color (azul, rojo, verde) que se genere si las células se tiñen con fluorocromos capaces de excitarse por acción del haz de láser (Davis *et al.*, 2002).

Los componentes típicos de un citómetro de flujo son la fuente para el haz de luz láser, el sistema de creación del flujo, un sistema óptico y un sistema de detección electrónica con una interfaz para mostrar los resultados. El sistema de flujo crea una presión suficiente como para provocar un haz laminar del mismo en el que las células pasen por el láser de una en una (Davis *et al.*, 2002).

En el caso específico de los analizadores hematológicos basados en citometría de flujo, se producen dos contajes independientes: uno para los eritrocitos, plaquetas y reticulocitos y otro para los leucocitos, tras la lisis de los elementos previamente citados (Weiser *et al.*, 2007). En esta segunda muestra, al igual que en los equipos de impedancia, se suele determinar también la hemoglobina mediante técnicas de espectrofotometría. Concretamente, la mayoría de equipos determina la hemoglobina mediante el método de referencia del comité internacional para la estandarización en hematología (International Committee for Standardization in Haematology, 1987).

Comercialmente estos equipos suelen indicar que son capaces de realizar un contaje diferencial de las cinco principales poblaciones leucocitarias, dado que la granularidad presente (sobre todo a nivel de neutrófilo y eosinófilo, siendo en todos los casos la fiabilidad mucho más cuestionable para los basófilos) en su citoplasma da lugar a una difracción muy específica del haz de luz de forma angular (Tvedten y Wilkins, 1988; Tvedten y Korcal, 1996).

Existen en la actualidad numerosas marcas comerciales y modelos de analizadores hematológicos basados en citometría de flujo. Dado que el objetivo de este trabajo no es realizar una revisión profunda de las características de los distintos modelos, sólo nos centraremos en los más comúnmente usados en laboratorios de referencia, así como aquellos equipos con interés en medicina veterinaria equina por su frecuente uso.

➤ El analizador LaserCyte (IDEXX Laboratorios) es un equipo que utiliza técnicas de citometría de forma exclusiva para el análisis hematológico. De forma más específica, dado que este analizador se utilizó en el presente trabajo, vamos a detallar las

especificaciones técnicas del mismo. LaserCyte evalúa un total de 24 parámetros hematológicos: HCT, RBC, Hb, MCV, MCH, MCHC, RDW, reticulocitos (número absoluto y porcentaje), WBC o conteo total de leucocitos, neutrófilos (número y porcentaje), linfocitos (número y porcentaje), monocitos (número y porcentaje), eosinófilos (número y porcentaje), basófilos (número y porcentaje) y plaquetas (PLT, MPV, PDW y PCT).

Para realizar este estudio, LaserCyte emplea unos 95 μ L de sangre entera con anticoagulante EDTA (se requieren 500 μ L de sangre entera en un tubo IDEXX VetCollect® de 13 mm x 75 mm). El analizador LaserCyte requiere aproximadamente 10 minutos para procesar por completo una muestra de un paciente. Además del tubo con anticoagulante EDTA, este analizador requiere que cada muestra vaya acompañada de otro tubo denominado CBC5R, el cual no ha de cargarse con sangre del animal, sino introducirse vacío en el equipo. Cada tubo CBC5R cuenta con un número determinado de *qualiBeads*. Las *qualiBeads* son partículas con características específicas respecto a su tamaño y difracción de la luz que el analizador utiliza como estándar interno para verificar la exactitud de la pipeta y el rendimiento del láser. La calibración del equipo se realiza de forma remota (vía *on-line* o mediante archivos enviados por correo ordinario) por la propia empresa IDEXX.

Este analizador presenta cuatro detectores separados. Los cuatro detectores de LaserCyte ofrecerán la información del tamaño, complejidad, granularidad y absorción de luz que posee cada célula analizada. LaserCyte realiza un gráfico de dispersión (o *scattergrama*) de cada una de las líneas celulares. En estos gráficos cada punto representa una sola célula, ofreciendo en un gráfico los datos de eritrocitos, reticulocitos y plaquetas y en otro los relativos a los leucocitos. Cada población celular aparece identificada como una nube de puntos cuya intensidad y compactación ofrece información sobre la variabilidad dentro de cada población, indicando por consiguiente la existencia o no de anomalías. En este sentido con una visualización rápida de estos gráficos junto con los valores numéricos podemos valorar la normalidad o no de la muestra procesada.

En ambos gráficos además de la información sobre las líneas celulares, LaserCyte ofrece información sobre otros eventos que están influyendo sobre los resultados obtenidos y que son importantes tener en cuenta a la hora de la interpretación de los resultados. Tales eventos son:

- Dobletes: dos células rojas de la sangre discretas que están en estrecha proximidad entre sí cuando son examinados por el rayo láser.
- Fragmentos de RBC: son porciones de las membranas de glóbulos rojos a partir de células rotas. Estas partículas tienen un tamaño similar a las plaquetas, pero refractan la luz de forma diferente y por lo tanto se encuentran a la izquierda de la población de plaquetas.
- Glóbulos rojos no lisados: eritrocitos no lisados que aparecen aislados en el gráfico de las células blancas.
- Tecnología *qualiBeads*. Cada tubo CBC5R contiene una cantidad conocida de *qualiBeads*. El analizador LaserCyte cuenta los *qualiBeads* en ambos gráficos, siendo una verificación de control para cada análisis.

En el gráfico o histograma de los glóbulos rojos de LaserCyte el eje vertical (y) presenta la luz absorbida por la célula (por tanto, diferenciándose por su tamaño entre plaquetas y eritrocitos). En el eje horizontal (x) se presenta la granularidad celular. En el caso del gráfico eritrocitario, son los reticulocitos las células con mayor “granularidad” debido a su contacto con el reactivo nuevo azul de metileno presente en los tubos CBC5R. El gráfico o histograma leucocitario presenta los mismos ejes, siendo la distribución de cada subtipo leucocitario muy característica de cada especie.

Este equipo también posee la ventaja de facilitar al hematólogo/veterinario una serie de avisos (alertas o flags) que indican la presencia de anomalías en la cantidad o morfología de algún elemento forme sanguíneo y precisan de una revisión más profunda por parte del clínico. De forma genérica, salvo algunas alarmas específicas para indicar errores internos de calibrado, la mayoría de estas alertas indican la existencia de un hallazgo hematológico anormal, exigiendo la realización de un conteo manual leucocitario y/o el examen de un frotis sanguíneo. En el caso del LaserCyte, se pueden diferenciar alertas relacionadas con hallazgos anómalos en la propia muestra sanguínea y alertas debidas a un mal funcionamiento/calibrado del equipo. Entre las primeras se deberían destacar las siguientes:

- VRL (*Value Out of Range* o valor fuera de rango). Alerta que aparece cuando el equipo detecta un parámetro (cualquiera) fuera del rango de detección de LaserCyte o fuera del intervalo de referencia considerado para la especie en

cuestión, mostrándose la misma para la revisión por parte del veterinario de este hallazgo.

- RD (*RBC Abnormal Distribution* o distribución anómala eritrocitaria). El equipo ha detectado un número excesivamente bajo de eritrocitos (entre 0,25 y 1 millón por microlitro), por lo que no ha determinado valores como el MCV, RDW, HCT, MCH y MCHC y se requiere la comprobación del resultado. Este mismo código también se utiliza cuando se detecta una distribución anómala de reticulocitos (*Reticulocytes Abnormal Distribution*), de forma concreta cuando los mismos suponen más del 30% de la población eritroide.

- WD (*WBC Abnormal Distribution* o distribución anómala de los leucocitos). El equipo requiere un examen manual del frotis y un diferencial leucocitario manual, pues se ha detectado una distribución anómala leucocitaria y algunas poblaciones leucocitarias no se han podido distinguir y clasificar correctamente. En algunos equipos LaserCyte con *softwares* recientes, esta alerta se suele acompañar de una segunda que concreta exactamente qué poblaciones han sido detectadas como aberrantes y entre qué leucocitos han existido problemas para diferenciar células. Así, dentro de la alerta WD, se pueden distinguir en algunos equipos las siguientes:

- Código DB 1/2. Problema en el algoritmo de diferenciación que requiere comprobación mediante el frotis sanguíneo. De forma específica este mensaje indica que la morfología celular de la muestra ha hecho difícil diferenciar entre los linfocitos y monocitos, por lo que los contajes y porcentajes de dichas subpoblaciones aparecerán en el resultado marcados con un asterisco.

- Código DB 1/3. Similar al anterior pero debido a dificultad para diferenciar entre neutrófilos y monocitos.

- Código DB 1-5. Dificultad para diferenciar entre todos los leucocitos de la muestra, por lo que la separación entre subpoblaciones ha de revisarse con un contaje manual.

- Código DB 2/8. Similar al código DB 1/5, si bien en este caso el equipo también avisa de posible confusión entre leucocitos y otros elementos formes circulantes, por lo que además de comprobarse el diferencial manual se debería evaluar el contaje leucocitario.

- Código DB 3/4. Problema del equipo para diferenciar/contar/separar las poblaciones neutrofílica y eosinofílica.
- Código DB 5. El equipo ha detectado más de un 2,5% de basófilos, por lo que se requiere la comprobación de este resultado mediante conteo diferencial manual.
- Código DB 7. Similar al DB 3/4, si bien el equipo también considera probable que el conteo total leucocitario esté alterado, por lo que se requerirá un conteo diferencial manual y también repetir el conteo leucocitario.
- Código DB 10. Durante el análisis el equipo ha detectado numerosos leucocitos con artefactos que han impedido su correcta evaluación y clasificación, lo cual puede deberse a una significativa y anómala fragilidad celular en la muestra del paciente o a problemas de temperatura interna del equipo. Este código requiere la evaluación completa de nuevo de la sangre, especialmente del conteo diferencial leucocitario.
- PA (*Platelet Aggregates Detected* o detectados agregados plaquetarios). El equipo sospecha de la presencia de agregados plaquetarios. Este código únicamente está disponible para la especie felina y en hurones en este equipo.
- PD (*PLT Abnormal Distribution* o distribución anómala de las plaquetas). El equipo ha detectado un conteo anómalo plaquetario y se requiere revisión del frotis sanguíneo para comprobar los resultados. Este código suele aparecer cuando el conteo es muy bajo o bien cuando se detecta la presencia de un elevado número de eritrocitos fragmentados que podrían haber sido confundidos con plaquetas.

En cuanto a las alertas de LaserCyte más relacionadas con un mal funcionamiento del equipo o calibrado, destacan las siguientes:

- HC (*HGB Channel Error* o error en el canal de la hemoglobina). Este código suele aparecer por la presencia de burbujas de aire en el canal de determinación de la hemoglobina, que podrían interferir en el análisis de la misma o bien en las diluciones llevadas a cabo para determinar su concentración y la

concentración leucocitaria. IDEXX aconseja volver a analizar la muestra si aparece este código.

- IQA (*Internal Quality Assurance Error* o error en el control interno de calidad). Este tipo de error suele aparecer cuando la distribución de los qualiBeads no es la típica y requiere volver a analizar la muestra.
- TI (*Temperature Out of Range* o temperatura fuera del rango). LaserCyte requiere una temperatura entre 15 y 26,8°C para funcionar, por lo que si durante el análisis no se ha conservado este rango aparece este código.

La empresa IDEXX también comercializa un analizador hemático de gama superior, orientado a grandes laboratorios con mayor volumen de trabajo, el equipo ProCyte. Este analizador, además de la misma tecnología de citometría de flujo presente en LaserCyte, utiliza una serie de fluorocromos específicos para proporcionar un recuento absoluto de reticulocitos altamente sensible y fiable. El proceso consiste en la tinción de las células de la muestra, dirigiendo la luz del láser (633 nm) a cada célula. La dispersión de la luz es medida y registrada desde múltiples ángulos. La medición de los ácidos nucleicos se logra de la forma más precisa capturando las longitudes de onda de 660nm y mayores. Este equipo utiliza tecnología propietaria de la empresa SYSMEX para la suma del volumen eritrocitario de cada glóbulo rojo determinado, obteniéndose así un valor de HCT más cercano al PCV.

➤ El analizador Cell-Dyn 3500 (Abbott Laboratorios), el equipo ForCyte (Oxford Science) y la nueva generación de equipos de la gama XE (Sysmex) desarrollan tanto un estudio mediante citometría de flujo como análisis de impedancia de la muestra y uso de fluorocromos, con diferentes algoritmos patentados por cada una de las empresas (Weiser *et al.*, 2007). La empresa Sysmex también poseen otros analizadores automáticos como las gamas XN, XT y XS, si bien su disponibilidad y adaptabilidad para pacientes veterinarios es en ciertos casos más escasa.

➤ El analizador Advia 120 (Bayer Diagnostics) es utilizado muy ampliamente en grandes laboratorios de referencia. Este equipo combina la tecnología de citometría de flujo con la citoquímica (Weiser *et al.*, 2007). En este caso específico, el equipo realiza un estudio citoquímico de los leucocitos, determinando la concentración de mieloperoxidasa presente para ayudar en la realización del diferencial leucocitario.

Esta técnica de identificación leucocitaria mediante mieloperoxidasa se considera el estándar de oro para el reconocimiento de subtipos leucocitarios, permitiendo una muy exacta diferenciación de células mieloides y linfoides. De forma más concreta, en esta reacción, tras lisado de los eritrocitos, se aporta a la muestra 4-cloro-1-naftol y peróxido de hidrógeno. Estas sustancias, bajo la acción de la mieloperoxidasa endógena de las células mieloides, dan lugar a un precipitado oscuro en los gránulos, que será reconocido por el analizador (detectándose en este caso la absorbancia de la luz blanca). Esta técnica tiñe la mayoría de los precursores granulocíticos (desde los promielocitos hasta los bandados), así como los monocitos, neutrófilos y eosinófilos maduros (Stirn *et al.*, 2014). Los linfocitos no se tiñen con esta técnica, mientras que los basófilos se tiñen pobremente, por lo que es necesario realizar una nueva reacción (denominada BASO), que, tras lisar todas las células salvo los basófilos, los detecta de forma individual.

Otra ventaja de este analizador es su capacidad para detectar agregados plaquetarios (hasta un cierto umbral de tamaño) y emitir un mensaje que alerta de su presencia tras realizar un hemograma (Clark *et al.*, 2002). Igualmente (aunque esta característica también está presente en LaserCyte, ProCyte y otros analizadores de gama media-alta), este analizador, según su fabricante, puede realizar contajes celulares en líquidos corporales de equinos, tales como el pleural o el abdominal (Gorman *et al.*, 2009).

Al realizar un diferencial mediante la técnica de la peroxidasa, el equipo obtiene un segundo contaje de todas las subpoblaciones, usándolo como un control interno de calidad y forma de identificar más fácilmente errores en la medición resultante mediante citometría de flujo normal o anomalías en la muestra. Uno de los problemas de este tipo de equipos es su alto coste, siendo únicamente asequibles en aquellos laboratorios con un volumen de muestras hematológicas muy elevado (Gaunt *et al.*, 1995). Otro analizador con características similares de la misma empresa es el Advia 2120i, presentando ambos una calibración específica para especies de interés veterinario.

8.5. Otros analizadores hematológicos.

Existen analizadores más actuales que dan la posibilidad de utilizar anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos para ampliar la información obtenida de las células estudiadas, si bien su uso es actualmente anecdótico en veterinaria. En este sentido el CELL-DYN Sapphire (Abbot), por ejemplo, usa un panel de anticuerpos monoclonales

específicos de células T como son los receptores CD3, CD4 y CD8 obteniendo información sobre los recuentos cada subtipo específico linfocitario (Fernandes *et al.*, 2002).

También existen analizadores hematológicos basados en morfometría. En estos equipos se utiliza un *software* específico que analiza imágenes del frotis sanguíneo de la muestra en pos de realizar un conteo leucocitario diferencial y reconocer células anómalas de forma más objetiva y rápida. El primero de estos sistemas fue descrito en 1966 (Prewitt y Mendlesohn, 1966), siendo sistemas lentos y con un bajo nivel de automatización por lo que han sido poco utilizados (Bentley, 1990). Recientemente se han desarrollado equipamientos capaces de realizar estas labores de recuento, diferenciación y estudio de la morfoestructura de células hemáticas a través de imágenes de alta resolución. Son el caso de CellaVision DM96 (CellaVision) para el estudio de células blancas, que utiliza además el software MATLAB adaptado para el estudio automático de la morfología y estructura de los eritrocitos (Criel *et al.*, 2016). En estos equipos, el dispositivo escanea la muestra, identificando los glóbulos blancos y toma imágenes digitales de ellos en alta definición. Estas imágenes son analizadas posteriormente mediante una red neuronal artificial basada en una base de datos de células preclasificadas. Todas las imágenes pueden ser reclasificadas por el operador y guardadas modificándose automáticamente la base de datos. Además de los leucocitos, el analizador permite estudiar los eritrocitos y el recuento y morfología de las plaquetas. En el caso de los glóbulos rojos, Piety y colaboradores (2015) han desarrollado un sistema de medición y evaluación automatizada de los eritrocitos combinando un sistema de microfluidos y el análisis de imágenes morfométricas de dichas células.

Este tipo de analizadores permite no solo realizar un recuento o un simple diferencial de células blancas, si no que estudia y clasifica automáticamente las anomalías encontradas tanto en eritrocitos como en leucocitos favoreciendo así un mejor y más rápido diagnóstico, además de ahorrar tiempo y dinero en el procesado y análisis de las muestras. No obstante este tipo de analizadores sigue requiriendo la supervisión de técnicos altamente cualificados en la morfología y estructura de las células hemáticas.

Las variables hematológicas del burro han sido estudiadas mediante métodos manuales (Nayeri, 1978; Yakubu y Chafe, 2008), contadores de impedancia (FX-21N de

Sysmex, Serono Baker System 9020, pocH-100iV Diff de Sysmex, Abacus Junior Vet de Diatron), equipos por citometría de flujo (analizador XT 2000i de Sysmex y Cell-Dyn 3500 de Abbot) y el Advia 120 (Zinkl *et al.*, 1990; Folch *et al.*, 1997; Mori *et al.*, 2004; Caldin *et al.*, 2005). No obstante, hasta este estudio, ningún trabajo había caracterizado la hematología asnal con el equipo LaserCyte. Igualmente, ninguno de los citados trabajos había realizado un estudio comparativo del rendimiento de los equipos y distintas técnicas en esta especie.

8.6. Limitaciones de los analizadores hematológicos.

De forma general, y más aún cuando nos centramos en equipos con tecnologías más modernas como aquellas basadas en el uso del láser, los analizadores automáticos obtienen resultados con mayor fiabilidad, sensibilidad y repetitividad que los contajes manuales. No obstante, la calidad de los contajes automáticos también depende del tipo de muestra del que se parta y las condiciones de almacenamiento (Cembrowski y Clarke, 2015). Independientemente de la técnica utilizada por el analizador automático, existen ciertas circunstancias o factores que conllevan errores en los contajes automáticos, siendo necesario tenerlos presentes a la hora de evaluar los resultados de un paciente. Los principales errores que suelen aparecer al utilizarse analizadores automáticos son los siguientes:

- La mayoría de analizadores automáticos son incapaces de reconocer los eritrocitos nucleados y los clasifican como leucocitos en los contajes diferenciales. Es por ello por lo que, ante muestras en las que se observe una elevada cantidad de este subtipo celular, es conveniente realizar correcciones de las fórmulas diferenciales, siguiendo la fórmula previamente mencionada (Weissert *et al.*, 2008).
- Ciertos analizadores (Advia 120) pueden confundir los eritrocitos fantasma o fragmentos de los mismos que aparecen tras un almacenaje de la muestra muy prolongado, dando lugar a trombocitosis artefactuales (Grondin y Dewitt, 2010).
- La formación de microcoágulos y agregados plaquetarios en la muestra de sangre puede conllevar la aparición de errores en los contajes automático. La activación plaquetaria durante la recolección y manejo de la muestra, puede conllevar la formación de agregados plaquetarios que falseen los contajes finales

de trombocitos. El EDTA también puede provocar la aparición de agregados leucocitarios o leucotrombocitarios, mayormente en individuos con anticuerpos unidos a la superficie de dichas células (Cramer y Lewis, 1972, Kovacs *et al.*, 1976; Layton *et al.*, 1989; Hu *et al.*, 2009; Auffray *et al.*, 2009). Para evitar este fenómeno, siempre sería aconsejable realizar un conteo manual específico de plaquetas en una muestra citratada. La formación de agregados plaquetarios no solamente puede artefactualmente disminuir los conteos plaquetarios (Jelkmann, 2007), sino que también puede provocar un falso aumento del MPV e incluso incrementar falsamente los conteos leucocitarios (Layton *et al.*, 1989; El Ouriaghli *et al.*, 2003).

- La autoaglutinación eritrocitaria puede conllevar un incremento falso en MCV y MCHC, disminuyéndose tanto el hematocrito como los conteos totales de eritrocitos (Gregoire *et al.*, 2007).

- La presencia de restos citoplasmáticos de los eritrocitos tras la lisis de los mismos puede conllevar un incremento artefactual en los conteos leucocitarios (El Ouriaghli *et al.*, 2003; Leberbauer *et al.*, 2005).

- En caso de muestras lipémicas, se puede observar un incremento en la hemoglobina total de la muestra, así como en los valores de MCHC, con más raros aumentos de los conteos leucocitarios y plaquetarios (Layton *et al.*, 1989).

- La presencia de numerosos cuerpos de Heinz en la muestra puede también elevar los valores de MCHC e incluso incrementar erróneamente los conteos automáticos de reticulocitos y/o leucocitos (Hou *et al.*, 1998; Bertrand *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005)

- Si el paciente muestra una paraproteinemia con elevadas concentraciones de inmunoglobulinas atípicas circulantes (normalmente IgM), la determinación de hemoglobina por espectrofotometría en algunos equipos automáticos puede incrementarse artefactualmente, así como el valor de MCHC (Arai *et al.*, 2009).

Además de este tipo de errores inherentes a las propiedades de las muestras y las técnicas utilizadas por los equipos automáticos, también hemos de reconocer que muchos de los errores laboratoriales en estos analizadores se deben a fallos humanos durante la recolección, manejo, dilución o preparación de la muestra. De forma específica, se ha de hacer máximo hincapié en la necesaria formación del personal que maneja este tipo de equipos, así como la adecuada calibración y uso de los controles en los mismos. Cada equipo debería de utilizarse en las especies para las que ha sido validado y calibrado y

cualquier uso fuera de las mismas requiere de un profundo estudio experimental y estadístico en pos de realizar una adecuada interpretación.

El tamaño de cada elemento forme sanguíneo es específico para cada especie de mamífero, existiendo amplias divergencias entre las mismas, tal y como ya se ha comentado. Incluso dichas diferencias, como ya hemos visto, pueden llegar a observarse entre distintas razas de la misma especie o entre individuos de distinta edad y sexo. En numerosos casos estas idiosincrasias específicas de especie o raza pueden llegar a provocar errores significativos en los analizadores, sobre todo si existe solapamiento entre poblaciones celulares atendiendo a los rangos preestablecidos en el *software* del equipo (Lebien, 2006).

9 Validación y estandarización de técnicas y equipos laboratoriales.

La Organización Mundial de la Salud define la validación como "la acción o proceso de probar que un procedimiento, proceso, sistema, equipo o método utilizado funciona como se esperaba y logra los resultados deseados". Para ello el investigador debe plantear unos objetivos claros y concisos y deben ser investigados utilizando protocolos de prueba previamente definidos, y su rendimiento validado ya sea con un método de referencia aceptado o un analizador existente en el mercado si no existe una metodología de referencia.

La estandarización de los métodos utilizados en el análisis laboratorial es fundamental para evitar que las condiciones ambientales que afectan a los mismos influyan en los resultados. Esta estandarización solo podrá alcanzarse cuando se hacen los mismos protocolos con el mismo alto nivel de exactitud, precisión y reproducibilidad.

Para llevar a cabo esta estandarización, primero hemos de considerar que existen dos tipos de métodos en biopatología clínica (Lumsden, 2000):

- Métodos definitivos. Aquellos que proporcionan con toda seguridad el valor de concentración o actividad del analito. Un ejemplo serían técnicas como la espectrometría de masas, que se suele utilizar para el desarrollo de materiales de referencia técnicos.

- Métodos no definitivos que hayan demostrado un muy bajo error respecto al valor “real” del analito. En numerosas ocasiones, estos métodos no definitivos son propuestos por los especialistas o laboratorios, basándose en las capacidades técnicas específicas de dicho método. En otras ocasiones, se considera como tal las observaciones generadas por múltiples laboratorios utilizando varios instrumentos y técnicas a disposición (Koch y Peters, 1999).

Un método de referencia o *gold standard* podría definirse de diversas formas, siendo las más aceptadas las siguientes: "un método que se ha investigado profusamente, demostrando una falta de exactitud residual respecto a su imprecisión" (Wu, 1994), "un método ampliamente investigado, con descripciones y protocolos exactos y profusos y que muestra una exactitud y precisión conmensurada respecto a su uso clínico" (Klee *et al.*, 1994) o bien como "una técnica que está al alcance de numerosos investigadores y clínicos y que, tras una profusa revisión, ha mostrado unos niveles aceptables de precisión y exactitud respecto a un método definitivo" (Takayama *et al.*, 1994). En hematología, la definición de "*gold standard*" es problemática, dado que solo para unos pocos parámetros existen métodos de referencia verdaderos o definitivos (Verbrugge y Huisman, 2015). Así, por ejemplo, el contaje manual diferencial leucocitario (usualmente sobre 400 leucocitos) ha sido considerado el *gold standard* para los contajes leucocitarios, si bien, tal y como se ha descrito, el mismo puede presentar errores estadísticos graves debido a una distribución celular no uniforme, errores en la interpretación morfológica, etc. Es por ello por lo que, en la mayoría de verificaciones de analizadores hematológicos, los datos del nuevo equipo se suelen cruzar o comparar con los de equipos de gamas superiores o previamente (y ampliamente) testados en el entorno clínico (Vis y Huisman, 2016). En hematología, para algunos de los parámetros estudiados, sí que se han propuesto métodos de referencia:

- Hemoglobina: método de la cianometehemoglobina, anteriormente explicado.
- Hematocrito: método del microhematocrito.
- Recuento de Reticulocitos: Citometría de flujo o recuento directo con tinción de azul de metileno.
- Recuento de eritrocitos y leucocitos: analizador automático por morfometría, propuesto, pero no ampliamente aceptado.

- Recuento diferencial de leucocitos: método manual usando tinción Romanowsky y analizado por dos técnicos con experiencia haciendo cada uno un recuento de 200 células. Según otros autores, el mínimo debería de ser de 400 células (Vis y Huisman, 2016).
- Recuento de plaquetas: Citometría de flujo con anticuerpo monoclonales específicos. Propuesto, pero no ampliamente utilizado.

El resto de parámetros hemáticos analizados carecen de métodos de referencia o *gold standard* por lo que su estandarización es más compleja y deberemos comparar el rendimiento de distintas técnicas o equipos.

Todos los criterios de estandarización y validación a nivel hematológico están regulados a nivel nacional e internacional por distintas organizaciones tales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), Organización Internacional de Normalización (ISO, *International Organization for Standardization*), el Comité de la Conferencia Europea e Internacional de Armonización (ICH, *International Conference on Harmonisation*), el Comité internacional de normalización de Hematología (ICSH, *International Council for Standardization in Haematology*) y El Instituto de estandarización de la clínica y el laboratorio (*Clinical & Laboratory Standards Institute* o CLSI), etc. Respecto a los analizadores hematológicos, existen diversas regulaciones y protocolos internacionales para su verificación y validación, de organizaciones como la ICSH (Briggs *et al.*, 2014), la CLSI (Rabinovitch *et al.*, 2010) así como la norma ISO 15189. Estas normas describen los test de verificación que la empresa que fabrica el analizador ha de llevar a cabo, así como los que el laboratorio debería de comprobar. Entre otros, destacarían pruebas de precisión (reproducibilidad), exactitud (comparativa de método), sensibilidad analítica (establecimiento de los límites de detección), estudio del efecto de sustancias interferentes, estudios de *carryover*, rango de análisis y linealidad dentro del rango de resultados esperados, entre otros. No obstante, ninguna de estas normas concreta los requerimientos mínimos de rendimiento de los equipos. Antes de desarrollar todos estos estudios, cada laboratorio ha de determinar cuáles serán, para cada analito, los errores máximos aceptables, lo cual dependerá en gran medida de las decisiones clínicas que a partir de los mismos se puedan desarrollar (Vis y Huisman, 2016).

En cualquier equipo o técnica laboratorial, podríamos definir tres tipos de errores (Westgard, 1999):

➤ **Error sistemático**, a veces también denominado desviación o *bias*. Diferencia entre el valor obtenido con el método propuesto y el valor real de la muestra. Para calcular este error es necesario hacer una comparativa entre técnicas/equipos y haber establecido previamente un *gold standard*. Este error puede ser constante o proporcional (si depende de la concentración o actividad del analito). El error sistemático se suele calcular como la media de las diferencias presentes entre técnicas/equipos al haber evaluado las mismas muestras o como la diferencia presente entre las medias de dichas mediciones en notación porcentual (Lumsden, 2000). Cuando determinamos el error sistemático de un equipo estamos evaluando su grado de **exactitud** (*accuracy* en inglés). Así pues, la exactitud de una técnica, método o equipo ha sido definida por la Federación Internacional de Químicos Clínicos (*International Federation of Clinical Chemists* o IFCC) como la medición de la cercanía o grado de acuerdo entre el valor medido y el valor “real” (Koch y Peters, 1999). No obstante, en algunos trabajos, la exactitud también puede referirse al error total, al compararse los resultados con el producido por el *gold standard* sin considerar la imprecisión de los métodos. De forma muy resumida, los estudios donde se comparan varios equipos o técnicas laboratoriales son básicamente trabajos que determinan la exactitud (y el error sistemático) de los mismos.

➤ **Error al azar**, o *random error*. Cantidad de variación inherente al método o al equipo analizado, estando el mismo relacionado con el grado de imprecisión de la técnica, equipo o metodología. La **precisión** depende de la repetitividad del ensayo y suele ser independiente de la exactitud del mismo (Harvey, 2012). La precisión puede calcularse mediante el denominado coeficiente de variación (CV). Este parámetro, obtenido al dividir la desviación estándar entre la media (multiplicándolo por 100 para poder expresarlo como porcentaje), tiene la ventaja de ser independiente del valor absoluto del analito. Es por ello por lo que el CV de una técnica o equipo demuestra fácilmente la imprecisión del mismo (Lumsden, 2000). De forma genérica se admite que una técnica precisa ha de presentar un CV inferior al 10%, indicando este dato una elevada reproducibilidad de los resultados, si bien, tal y como veremos, este porcentaje es variable según el parámetro estudiado. En los estudios de precisión se pueden realizar dos tipos de análisis para caracterizar el error al azar:

- Estudios de replicación intraensayo (o *intrarun*). En este caso se determina la repetitividad de los resultados de una misma muestra (Lumsden, 2000; Wenger-Riggenbach *et al.*, 2006). Se pueden realizar análisis de repetitividad y reproducibilidad, entendiéndose la primera como el grado de cercanía entre resultados sucesivos de la misma muestra realizados bajo condiciones similares (mismo operador, equipo, etc.) y siendo la reproducibilidad la cercanía entre los resultados de la misma muestra, pero bajo distintas condiciones externas. Para estos estudios se pueden utilizar muestras de pacientes, sueros liofilizados estandarizados, etc. Se recomienda un mínimo de 20 repeticiones para cada muestra, obteniéndose la media, desviación estándar y coeficiente de variación (Knoll y Rowell, 1996).

- Por el contrario, la precisión entre-ensayos o *between-batch* se calcula determinando la variabilidad de las mediciones realizadas sobre una misma muestra durante distintos días (normalmente a lo largo de 20 días). Este último parámetro está afectado tanto por el error al azar como por el efecto “deriva” (variaciones al azar debido a distinto comportamiento del equipo durante distintos días) (Vis y Huisman, 2016). Este tipo de precisión también se suele expresar como coeficiente de variación (CV).

De forma genérica, y si bien existen variaciones según el equipo estudiado y el laboratorio en el que se ha realizado el trabajo, se acepta que los métodos automáticos para determinación hematológica presentan una mayor precisión y menor CV que los métodos manuales. Así, por ejemplo, se describen coeficientes de variación del 15 y 13% para contajes leucocitarios y plaquetarios manuales, frente a un 2 y 4% para las mismas variables mediante técnicas automáticas (Harvey, 2012). No obstante, hemos de considerar que estos son valores de precisión y, tal y como se ha descrito, la exactitud no tiene por qué estar relacionada con la precisión. Es decir, los resultados de los contajes manuales son menos repetibles que los de los contajes automáticos, si bien esto no conlleva que los mismos sean menos cercanos a los valores reales de la muestra.

En el caso de la fórmula diferencial leucocitaria, el CV varía según el número total de leucocitos contados sobre el cual se realiza el cálculo del porcentaje de cada población, dependiendo también del subtipo celular que se considere (siendo menor en poblaciones más numerosas). Así, por ejemplo, en un reciente estudio, el porcentaje de neutrófilos

mostró CVs de 9, 6 y 5% según se realizase sobre contajes totales de 100, 200 o 400 células (Harvey, 2012). De forma comparativa, los coeficientes de variación para el caso de los basófilos en estos tres ejemplos fueron de 94, 42 y 33%.

➤ **Error analítico o error total.** Se corresponde con la suma de los errores al azar (imprecisión) y los errores sistemáticos (desviaciones o *bias*) del equipo o técnica en cuestión (Koch y Peters, 1999). A pesar de existir numerosas formas de calcular este error total observado, una de las más utilizadas y fáciles es expresarlo de acuerdo a la siguiente ecuación (Rishniw y Pion, 2016):

$$\text{Error total observado} = \text{bias} + 2 \times \text{CV (expresado en \%)}$$

Una vez se ha calculado el error total de una técnica o equipo para un analito, hemos de compararlo con el error máximo admisible para el mismo. Para ello, normalmente de forma previa al estudio, hemos de definir el error máximo que deberíamos aceptar según cada parámetro. El error máximo admisible (considerado como error total) debería tener en cuenta características del propio analito y especie estudiada, como por ejemplo el rango de referencia en animales normales, los cambios que experimenta durante la enfermedad, la importancia que le concede el clínico a dichos cambios, etc. (Farr y Freeman, 2008). Muchos de los comités y asociaciones previamente nombrados también proporcionan guías para determinar los requerimientos clínicos que la medición de un analito debería cumplir para ser considerada como útil e informativa (Cotlove *et al.*, 1970; Stockl y Reinauer, 1993).

Originariamente, en los años 60, se propusieron los denominados Límites de Error Aceptables de Tonks (LAE o ALE en inglés, por *Tonks' Allowable Limits of Error*), los cuales establecían dichos límites basándose en los rangos de referencia del analito (Tonks, 1968). Dichos ALE, expresados como porcentajes, se obtenían al aplicar la siguiente fórmula:

$$\text{ALE \%} = \pm \frac{1}{4} \text{ rango de referencia normal} \times \frac{100}{\text{media del rango de referencia normal}}$$

Inicialmente Tonks propuso un ALE máximo del 10%, si bien posteriormente se elevó esta cifra al 20% por la incapacidad para mantener las mediciones de diversos analitos dentro de límites aceptables según esta definición.

Un concepto similar, si bien se han propuesto infinidad de métodos para su cálculo, son los denominados *Maximum Total Error* (TE_{max} o TE_a) (Thienpot *et al.*, 1995), o **error máximo admisible** (sistemático o *bias* más imprecisión, normalmente expresado como CV) que puede mostrar una técnica. Este dato normalmente se consensua entre expertos.

Los TE_a para hematología veterinaria han sido propuestos muy recientemente (Rishniw y Pion, 2016), sin que aún hayan sido ampliamente aceptados. Estos valores orientativos se recogen en Tabla 2.

En el mismo año, Cook y colaboradores (Cook *et al.*, 2016), basándose en encuestas a 41 especialistas a nivel mundial, establecieron distintos TE_a a tres niveles (nivel de analito normal, rangos bajos y rangos altos) para varios parámetros hematológicos, tal y como aparecen en Tabla 3.

Tabla 2. *Error total aceptable (%) para diferentes parámetros hemáticos en veterinaria (Rishniw y Pion, 2016).*

Parámetro	TEa (%)
Recuento eritrocitario	10
Hematocrito	10
Hemoglobina	7
Recuento leucocitario	20
Recuento plaquetario	25
Neutrófilos (número total)	10
Linfocitos (número total)	10
Monocitos (número total)	7
Eosinófilos (número total)	20
Basófilos (número total)	25

Tabla 3. *Error total aceptable (%) para diferentes parámetros hemáticos según el nivel de los mismos (Cook *et al.*, 2016).*

Variable	TEa (%)		
	Nivel bajo	Nivel medio	Nivel alto
Recuento eritrocitario	20	13,3	10

Hematocrito	13,3	12,8	8,3
Hemoglobina	12	11,1	7,7
Recuento plaquetario	20	13,3	7,1
Recuento leucocitario	20	16,6	12
Neutrófilos	20	13,3	13,3
Linfocitos	25	16,6	16,6
Eosinófilos	90	25	25
Monocitos	60	20	20

Por tanto, tras todo lo comentado, una de las formas más directas de evaluar un equipo, técnica o instrumento sería determinar su error total y comprobar si el mismo queda dentro de los límites establecidos como TEa para el parámetro problema. Sin embargo, tal y como hemos detallado, los TEa suelen ser límites subjetivos y que pueden variar según las circunstancias (clínicas, de nivel del analito, etc., etc.). Por ello se han desarrollado otra serie de parámetros para poder evaluar técnicas, equipos e instrumentos que tienen en consideración otros factores además de estos TEa.

Uno de los índices más utilizados con este objetivo es la técnica estadística de sigma (σ). Este parámetro se puede calcular cuando se conoce el error admisible (TEa), el *bias* o falta de exactitud (en %) y el CV del equipo para ese parámetro, siguiendo la siguiente fórmula (Westgard, 2006):

$$\sigma = (TE_a - \% \text{ bias}) / CV$$

Un valor de $\sigma > 6$ supone un (equipo/técnica/método) con rendimiento muy elevado, denominado normalmente como “de clase mundial”, mientras que valores por debajo de 3 detectan métodos que no han de ser utilizados por ser poco fiables. A su vez se pueden subclasificar los métodos según este valor, siendo aquellos con σ superior a 5 de un rendimiento excelente, bueno si es mayor a 4 y marginal si es mayor a 3 (Cook *et al.*, 2016). Para técnicas con σ inferior a 6 se puede calcular un nuevo parámetro, denominado índice de calidad de objetivo o *quality goal index* (QGI), siendo el mismo un ratio expresado según la siguiente fórmula:

$$QGI = \frac{\text{bias} (\%)}{1.5 \times CV (\%)}$$

El QGI determina si es la poca exactitud (amplio *bias*, elevado error sistemático), la imprecisión (elevado CV) o ambos factores los causantes del pobre rendimiento de la

técnica o equipo (Parry, 2016). Un QGI inferior a 0,8 indica que la imprecisión es la máxima responsable de la baja fiabilidad del método, mientras que, si el QGI es superior a 1,2, el problema reside en la inexactitud. Para valores intermedios ambos errores tendrían importancia.

Además de los estudios centrados en caracterizar la exactitud y precisión de los equipos, también se han de testar una serie de parámetros en cualquier analizador, técnica o instrumento para poder realizar una correcta validación y calibración. Entre estos otros estudios cabrían destacar las siguientes:

- **Estudios de interferencia.** Se realizan para evaluar el efecto de la hemólisis, ictericia y lipemia sobre la determinación del equipo o técnica (Glick *et al.*, 1986; NCCLS, 1986b; Jacobs *et al.*, 1992). Con estos estudios se analizan posibles causas de errores sistemáticos por baja especificidad del método. Normalmente en estos estudios se utilizan alícuotas de suero con distintas diluciones de las sustancias interferentes por duplicado o triplicado para estudiar el efecto de las mismas (Glick *et al.*, 1986). Una vez obtenidos los resultados, se comparan las mediciones de las diluciones sin sustancia interferente con el pareado con presencia de la misma y se determina si el grado de variación es aceptable. En veterinaria estos estudios deberían de realizarse para cada especie, teniendo en consideración que la mayoría de equipos o técnicas están diseñados para humanos (Jacobs *et al.*, 1992). En muchos laboratorios la determinación de la concentración de estas sustancias interferentes (y la ponderación del posible efecto de las mismas sobre distintas técnicas) se basa en la comparación de la muestra con escalas prediseñadas de sueros con hemólisis, ictericia o lipemia.

- **Estudios de recuperación (*recovery*).** En estos análisis se determina el error sistemático proporcional de la técnica o equipo debido a la presencia de distintas sustancias en la muestra que compiten con el analito objeto de estudio (Lumsden, 2000). Dentro de estos análisis también se evalúa el denominado “efecto matriz”, el cual se definiría como el efecto que presenta sobre la medición todos los elementos presentes en la muestra distintos al analito problema. Entre dichos elementos cabría destacar los iones, sustancias con capacidad osmolar, etc. Para desarrollar estos estudios de recuperación se crean distintas alícuotas con el analito

problema sobre un suero con una concentración conocida del mismo, evitando un efecto dilucional mayor al 10% y se estudia gráfica y estadísticamente los resultados obtenidos por cuadruplicado (Westgard, 1999). El resultado final se resta a la concentración conocida inicial, obteniéndose así la concentración recuperada estimada. Dicha estimación se divide entre la cantidad añadida de analito y, al expresarla en porcentaje, da lugar a la tasa de recuperación.

- **Estudios de linealidad o del rango analítico.** La linealidad se puede definir como la capacidad de los equipos de aportar resultados adecuados y fiables tanto a elevadas como bajas concentraciones para un analito. Toda técnica laboratorial ha de presentar linealidad para el rango de trabajo para el que se haya diseñado. Dicho rango suele definirse de forma preliminar por expertos o por parte de la propia empresa que diseña el equipo o kit diagnóstico. Para llevar a cabo estos estudios se suelen utilizar dos muestras, una cercana al rango inferior de medición (o a 0) y otra al rango superior del mismo (Wenger-Riggenbach *et al.*, 2006). Tras realizar varias mezclas de dichas muestras se representa en un gráfico los resultados obtenidos para evaluar la linealidad de las mediciones (NCCLS, 1986a). En dicho gráfico, la línea de correlación debería cortar el eje Y en el punto 0 y el valor del coeficiente de correlación (r) debería ser lo más cercano a 1. Esta determinación no es muy comúnmente utilizada en los artículos de investigación comparada en veterinaria, si bien sí que se ha testado utilizando muestras con una elevada concentración de algún parámetro (a nivel basal) y sucesivas diluciones de la misma. Para un estudio estadístico más profundo del nivel de linealidad, existen tests específicos que determinan si la misma es adecuada o no, siendo el más utilizado en patología clínica el test de Emancipator-Kroll (Kroll y Emancipator, 1993). En la Tabla 5 se recogen los datos de linealidad que habrían de cumplir los analizadores hematológicos (según reportes en medicina humana).

- **Sensibilidad y especificidad (de las alertas).** Al hablar de estos parámetros en estudios de verificación/validación de analizadores hematológicos, usualmente nos estamos refiriendo a la capacidad del equipo de establecer una alerta (*flag*) ante un resultado anómalo y no mostrarla ante resultados normales. Como comparativa para detectar fallos en estos estudios se debería utilizar el contaje diferencial sobre 400 leucocitos (Koepke *et al.*, 2007). No obstante, no todas las

anomalías morfológicas guardan la misma importancia desde el punto de vista clínico, por lo que la mayoría de autores se centran en las *flags* generadas por la presencia de leucocitos de morfología anómala, presencia de agregados plaquetarios y/o presencia de células blásticas. La sensibilidad es importante desde el punto de vista diagnóstico (para la detección de patologías), en tanto en cuanto la especificidad lo es para limitar el número de exámenes microscópicos innecesariamente realizados, incrementándose por tanto la eficiencia laboratorial (Vis y Huisman, 2016). El cálculo de estos dos parámetros, así como de los valores predictivos (positivos-VPP- y negativos-VPN-) sigue las siguientes fórmulas:

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{(VN + FP)} \times 100$$

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{(VP + FN)} \times 100$$

$$\text{VPN} = \frac{VN}{(VN + FN)} \times 100$$

$$\text{VPP} = \frac{VP}{(VP + FP)} \times 100$$

$$\text{Eficiencia General} = \frac{VP + VN}{(VP + FP + VN + FN)} \times 100$$

En dichas formulas un verdadero positivo (VP) sería una muestra con anomalías morfológicas y que muestra una alerta del analizador; un verdadero negativo (VN) sería una muestra normal sin alerta; un falso positivo (FP) sería una muestra normal con una alerta y un falso negativo (FN) una muestra con presencia de anomalías morfológicas que no ha sido señalada por el analizador. Para muestras de hematología, estos índices han de ser similares a los que aparecen en Tabla 4 (Vis y Huisman, 2016).

Tabla 4. Índices tolerados en las alertas de los analizadores hematológicos (Vis y Huisman, 2016).

Especificidad	> 70
Sensibilidad	> 90
Valor predictivo negativo (VPN)	> 95
Valor predictivo positivo (VPP)	> 60
Eficiencia General	> 75

- El **background o límite de blanco** se refiere a la cantidad de señal (la medición o ruido) que aparece en una muestra sin que sea originada por el analito de interés. Este *background* puede estar causado por sustancias interferentes en el suero o por interferencias electrónicas del analizador con otros equipos del laboratorio (Vis y Huisman, 2016). Idóneamente este ruido debería ser igual a 0. Este *background* condiciona también el límite de detección inferior del equipo, pues el mismo se podría definir como aquella concentración del analito problema más baja que puede ser detectada y distinguida del ruido de *background* (Vis y Huisman, 2016). En el Tabla 5 se reflejan los valores estandarizados de *background* que deberían cumplir los analizadores automáticos hematológicos para distintos parámetros (de acuerdo a criterios de medicina humana).

- Por último, en algunos de estos trabajos también se determina el efecto denominado *carryover*. Dicho efecto se podría explicar como el grado de anomalía que la medición de una muestra con valores extremos provoca en las mediciones posteriores. En el caso concreto de los analizadores automáticos hematológicos, el *carryover* se podría definir como la cantidad de analito que el analizador lleva de una muestra a la siguiente medición (Briggs *et al.*, 2014; Verbrugge y Huisman, 2015). El efecto usualmente es la falsa elevación de los valores de las muestras que se miden tras una muestra que realmente presentaba valores elevados. Este efecto suele ser importante tanto para RBC, WBC como plaquetas. Para evaluar este efecto los investigadores suelen preparar muestras (o testar una muestra previamente conocida) con valores extremos, determinando el efecto que dicha medición comporta en sucesivas determinaciones de muestras normales (Becker *et al.*, 2008). También se puede medir por triplicado una muestra con valores elevados (H1, H2, H3) y a posteriori medir por triplicado una muestra con valores bajos (L1, L2, L3), obteniéndose el porcentaje de *carryover* según la siguiente ecuación (Vis y Huisman, 2016):

$$\frac{(L1 - L3)}{(H3 - L3)} \times 100$$

Los requerimientos actuales para el *carryover* de distintos parámetros hematológicos se muestran en Tabla 5.

Tabla 5. Valores requeridos para carryover, background y linealidad en pruebas hematológicas (Vis y Huisman, 2016).

	Carryover (%)	Background	Linealidad (r)
Hb	< 0.4	< 0,07 g/dL	> 0,99
RBC	< 0.5	< 0,01 x 10 ⁶ /μL	> 0,99
WBC	< 0.2	< 0,01 x 10 ³ /μL	> 0,99
PLT	< 0.5	< 0,5 x 10 ³ /μL	> 0,99

Hb: hemoglobina; RBC: células rojas; WBC: leucocitos; PLT: recuento plaquetario.

Por último, hemos de considerar que la calidad de los análisis hematológicos no depende únicamente del método o tecnología usada, jugando en ella un papel fundamental la correcta praxis llevada a cabo por el laboratorio. En este sentido, cada laboratorio debería implementar una serie de controles de calidad encaminados a verificar el buen funcionamiento de los equipos, así como a confirmar mediante métodos de referencia (externos o internos) que los resultados obtenidos por sus controles se encuentran en los rangos de referencias descritas (Cembrowski y Clarke, 2014).

Entre los diferentes controles de calidad que un laboratorio de hematología debería implementar, caben destacar los siguientes:

- Controles de calidad específicos de equipo: se trata de muestras con datos conocidos de antemano que se utilizan como calibración para el analizador hematológico. En ciertos equipos (como el analizador LaserCyte), estas muestras se han sustituido por evaluaciones on-line del rendimiento del equipo mediante ciclos de calibración específicos.
- Control de calidad con datos de pacientes: los resultados del paciente pueden utilizarse como complemento de control de calidad actuando como referencia durante las transiciones de nuevos lotes de material.
- Control interparamétrico: basado en las relaciones aritméticas existentes entre diferentes analitos, como por ejemplo entre la cantidad de glóbulos rojos, la cantidad de hemoglobina y el hematocrito.
- Controles delta: son comparaciones realizadas entre análisis de un mismo paciente en tiempos diferentes. Si la diferencia excede un límite predeterminado, puede

deberse a un error en la analítica anterior, en la actual, a errores en ambas o a un cambio biológico esperado o no.

- Control con promedio de pacientes: basado en el uso de los datos medios obtenidos de pacientes cuyos resultados se encuentran en los valores de referencia para los diferentes parámetros. Se calculan los rangos promedios y se analizan, pudiendo localizarse así errores promedios para los diferentes parámetros. Es importante tener en cuenta la idiosincrasia de cada paciente incluido en el estudio, puesto que en función de su estado de salud los resultados pueden ser sesgados y erróneamente analizados.
- Control de calidad entre laboratorios: basado en el cruce de información entre laboratorios que poseen sistemas de análisis similares o compatibles, pudiendo alguno de ellos compartir incluso los sistemas de calidad.

10 Comparación de técnicas y equipos laboratoriales.

El uso de nuevos equipos, técnicas o reactivos en patología clínica veterinaria normalmente responde a un interés por conseguir mayor exactitud y repetitividad diagnóstica, así como reducir los requerimientos técnicos, mejorar la eficacia y rapidez de las pruebas y reducir el precio final unitario por test (Lumsden, 2000). A la hora de escoger un equipo o una técnica diagnóstica se han de considerar tanto circunstancias inherentes al centro laboratorial (personal a disposición, formación del mismo, espacio disponible) como las relativas a las muestras a evaluar (carga de trabajo, tipo de muestras a testar, necesidades de precisión y exactitud, etc.). No obstante, en última instancia, la instauración de un nuevo equipo o técnica en un laboratorio suele responder a una búsqueda de una mayor precisión y exactitud de las mediciones, en pos de conseguir mejores resultados para los clínicos.

Tal y como hemos comentado anteriormente, en los estudios de comparación entre equipos o técnicas se suele determinar la exactitud de los métodos, es decir, se calcula el error sistemático (*bias* o desviación) que presenta un nuevo método o equipo respecto al *gold standard* (Lumsden, 2000). En el caso de observarse un error o desviación, el mismo se puede clasificar como constante, proporcional o una combinación de los mismos.

A la hora de diseñar estos experimentos se ha de tener en consideración el número de muestras estudiadas, si las mismas se van a evaluar por duplicado o no y el periodo de tiempo en el que se realiza dicha comparativa. En este último aspecto, es esencial que las mediciones con cada equipo o técnica se realicen con un máximo de pocas horas de variación entre sí, evitándose así diferencias debidas al envejecimiento intrínseco de la muestra (Koch y Peters, 1999; Westgard 1998), que provocarían imprecisión (errores al azar) que podrían tergiversar la comparativa entre los equipos.

En el caso de datos continuos se aconseja un mínimo de 40 muestras de distintos pacientes para este tipo de comparativas (Lumsden, 2000), las cuales deberían representar todo el rango de mediciones usualmente presentes en una población. Si aumentamos dicho número de pacientes estudiados, la fortaleza de la comparación será mucho mayor. Idealmente, y en caso de ser posible, cada muestra debería medirse por duplicado en cada uno de los métodos o equipos analizados, variando el orden de medición de forma aleatoria.

Una vez obtenidos los resultados, los mismos se suelen representar gráficamente y se realiza un primer examen visual para detectar la presencia de diferencias y el grado de comparabilidad entre ambos métodos o equipos. Este análisis gráfico también sirve para detectar valores en desacuerdo a la tendencia general y que deberían volver a ser determinados. En los últimos tiempos, este examen visual ha adquirido una gran importancia debido al surgimiento de numerosos especialistas que han criticado el mal uso de los coeficientes de correlación y la excesiva interpretación de las líneas de regresión al comparar métodos (Pollock *et al.*, 1992).

Generalmente, las representaciones gráficas obtenidas son las siguientes:

➤ En una primera representación gráfica, denominada **gráfico de Bland-Altman**, *difference plot*, *bias plot* o *residual plot*, propuesta por Bland y Altman en 1986, se representan las diferencias entre el test de referencia y el nuevo test en el eje de ordenadas versus las mediciones medias con ambos métodos en el eje de abscisas, como se muestra en el Figura 1. En ciertos trabajos, en el eje de abscisas se representa los resultados con el *gold standard*.

La línea que aparece centralmente representa el *bias* (error sistemático) del nuevo método respecto al método de referencia (normalmente calculado en este gráfico como la desviación media, en términos absolutos). Además, Bland y Altman propusieron establecer dos líneas paralelas a la línea de la gráfica, dentro de las cuales estarían el 95% de los resultados obtenidos con el nuevo test (límites de concordancia o *agreement* al 95%) (Hyloft *et al.*, 1997; Giavarina, 2015). Para calcular estos límites normalmente se utiliza la media de las diferencias más menos 1,96 la desviación estándar de dichas diferencias (Giavarina, 2015).

En este gráfico las diferencias deberían aparecer uniformemente distribuidas sobre la línea del 0, estando la mitad sobre la misma y el resto debajo. De hecho, si ambos métodos o equipos fuesen totalmente equiparables en su rendimiento, el 68% de los datos deberían de estar integrados en la zona de media más menos una desviación estándar y el 95% de los mismos en media más menos 1,96 desviaciones estándar (Hyloft *et al.*, 1997).

Este gráfico permite detectar un *bias* sistemático (positivo o negativo) así como valores *outliers*. Este tipo de gráfico también permite ver el comportamiento del analito medido en el nuevo equipo/técnica. Así, si el tipo de variación varía con la concentración detectada, se puede sospechar la presencia de un error proporcional (Westgard, 1995).

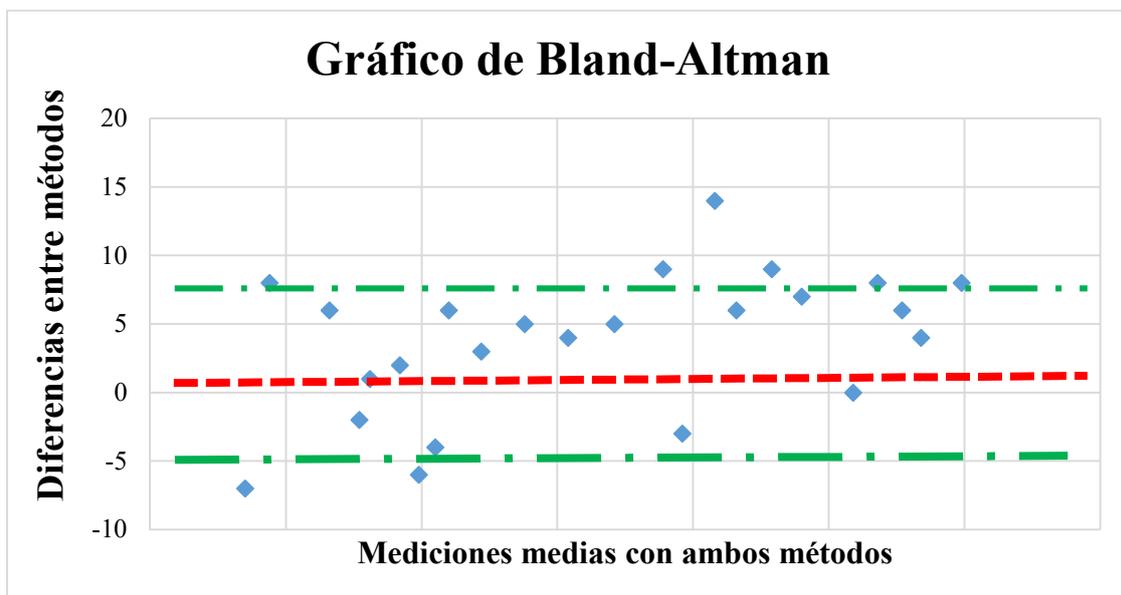


Figura 1. *Difference Plot (Bland y Altman, 1986).*

➤ Además de este gráfico, también podemos estudiar el denominado *comparison plot*, (Figura 2) en el cual se representan las mediciones (X) del método

estándar versus las mediciones (Y) del nuevo método, así como la línea de regresión obtenida y los intervalos de referencia para dicha regresión (Linnet, 1998).

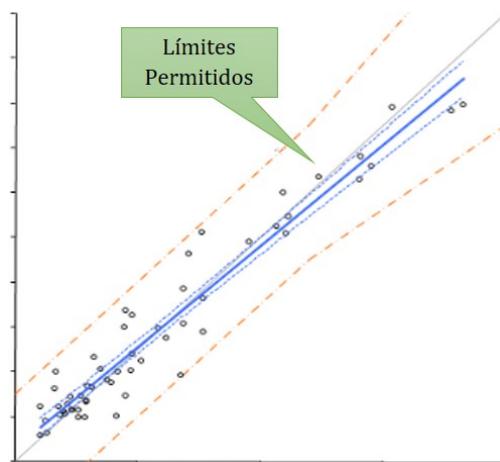


Figura 2. *Comparison Plot* (Linnet, 1998).

En este gráfico también se pueden incorporar dos bandas que representen los intervalos de confianza al 95% respecto a dicha línea de regresión. Muy comúnmente también se incorpora en estos gráficos la denominada línea de identidad, la cual representa la línea que se formaría si los resultados fuesen idénticos independientemente del método utilizado ($x=y$). Con esta representación también podremos tener una idea genérica de la linealidad en las mediciones observando tanto la pendiente como la zona de intercepción con el eje Y (Jones y Payne, 1997).

El estudio estadístico de la comparativa entre equipos puede llegar a ser un desafío para el investigador. Es esencial tener siempre presente que una correcta correlación entre ambos equipos no tiene por qué estar asociada a un buen *agreement* (acuerdo, comparabilidad, traducibilidad, reciprocidad, etc.) de las mediciones de ambos. Dado que no solo se ha de conocer la correlación entre los datos de varios equipos, normalmente se hacen necesarios test estadísticos más precisos y que requieren un mayor trabajo matemático.

Tradicionalmente se ha utilizado la **regresión lineal** (junto con el método de estimación de los mínimos cuadrados) para estimar la comparabilidad entre métodos, obteniéndose tanto la pendiente (*slope*) como el punto de intersección (punto donde la

línea de regresión corta al eje) del *comparison plot*. No obstante, estudiar ambos métodos con esta técnica únicamente sería válido si su relación es lineal. Igualmente, si se utiliza este método se está dando por seguro que el método de referencia no presenta error alguno, que el error de la nueva técnica es constante (y no proporcional) y que los errores de la nueva técnica están distribuidos normalmente (Jones y Payne, 1997; Lumsden, 2000). En la realidad, estas premisas no suelen cumplirse en la mayoría de estudios, por lo que se acepta que la regresión lineal únicamente sería válida para esta comparación si el coeficiente de correlación (r) fuese igual o superior a 0,99. Otra limitación de este método es que, a pesar de que la pendiente de la línea parezca ideal ($r=1$ utilizando el producto de correlación de Pearson) aún puede existir una desviación constante significativa de trasfondo (Shoukri y Pause, 1999). Debido a estas limitaciones, para muchas comparativas entre métodos/equipos, es necesario el uso de otros test estadísticos alternativos más complejos, como los siguientes:

La **regresión DEMING** es un método que permite determinar la imprecisión en ambos métodos, así como el nivel de acuerdo entre ambos (Jones y Payne, 1997). Un inconveniente de este tipo de estudio de regresión es que la imprecisión ha de estar distribuida de forma normal (Strike, 1991). Una variación de este tipo de regresión (denominada regresión *weighted* DEMING) puede utilizarse en caso de que dicha distribución no se cumpla (Linnet, 1990).

La **regresión Passing-Bablok** es otro método que permite realizar estas comparaciones teniendo presente la existencia de errores en ambos métodos analizados. Una de las ventajas de este estudio estadístico es que los errores no tienen por qué presentar una distribución normal e incluso valores extremos u *outliers* pueden ser incluidos en el análisis. Debido a su versatilidad, la mayoría de publicaciones en patología clínica veterinaria usan este tipo de regresión. Con este tipo de regresión se obtienen los mismos datos típicos de una regresión lineal, que pueden también presentarse en un *comparison plot*:

- Línea de regresión, de acuerdo a Passing-Bablok.
- Línea de identidad ($x=y$), que presupone acuerdo total entre métodos.
- Intervalos al 95% de confianza para dicho acuerdo. Se calculan basándose en la línea de regression $\pm 1,96$ desviaciones estándar (de la diferencia entre ambos métodos). El 95% de los datos (o de las diferencias puntuales entre métodos) está

comprendido en dicho intervalo. Cuando en un *comparison plot* se observan intervalos muy amplios, ello quiere decir que los dos métodos son poco comparables.

- Ecuación de regresión, la cual a su vez recoge:
 - El valor A, o intercepción, es un valor relacionado con el error sistemático entre ambos equipos. El test de Passing-Bablok también calcula el intervalo de confianza al 95% para este parámetro. Este intervalo ha de contener al valor 0. En caso contrario significa que existen diferencias constantes entre métodos.
 - La pendiente (*slope*) B. Este valor se relaciona con la presencia de diferencias proporcionales entre métodos. En el test de Passing-Bablok también se calcula el intervalo 95% para B. Si el mismo no incorpora el valor 1 significa que existen diferencias (errores) proporcionales entre métodos.

Además de estos estudios, también se pueden comparar los resultados de ambos métodos con un test t pareado, correlación de Pearson o, a ser posible, el coeficiente de correlación de concordancia (Lin, 1989). Utilizando estos coeficientes de correlación, de forma genérica, se considera que la comparabilidad entre dos técnicas o equipos es excelente si la $r \geq 0,95$, muy buena cuando $r = 0,90-0,94$, buena si $r = 0,80-0,89$, moderada en casos donde la $r = 0,59-0,79$ y pobre si el valor de dicha correlación es bajo, es decir $r < 0,59$ (Welles *et al.*, 2009).

Por último, y como ayuda para determinar si el uso de un nuevo método/equipo es aceptable o no, se han creado distintos gráficos de decisión (Westgard, 1995). En esta publicación, Westgard definió los gráficos denominados MEDx (*Method Evaluation Decision*). En ellos se representa en el eje X, la imprecisión (coeficiente de variación) del método testado y en el eje Y, la diferencia (*bias*) respecto al *gold standard* (véase Figura 3). Para conocer el rendimiento de la nueva técnica, Westgard propuso trazar tres líneas en dicho gráfico, cada una representando un TEa diferente:

- Una línea que representase un criterio de aceptabilidad de *bias* en porcentaje (diferencia entre las medias de las mediciones de ambos métodos) más dos CV del método a testar.
- Una segunda línea que representase *bias* más tres CV.

- Una última línea representando *bias* más cuatro CV.

Dichas líneas delimitan cuatro áreas distintas (rendimiento excepcional, bueno, marginal, pobre) para cada técnica laboratorial y, conociendo el *bias* de la misma respecto al *gold standard* y el CV de esta nueva técnica o equipo, podemos determinar en qué área de rendimiento se encuentra este nuevo test.

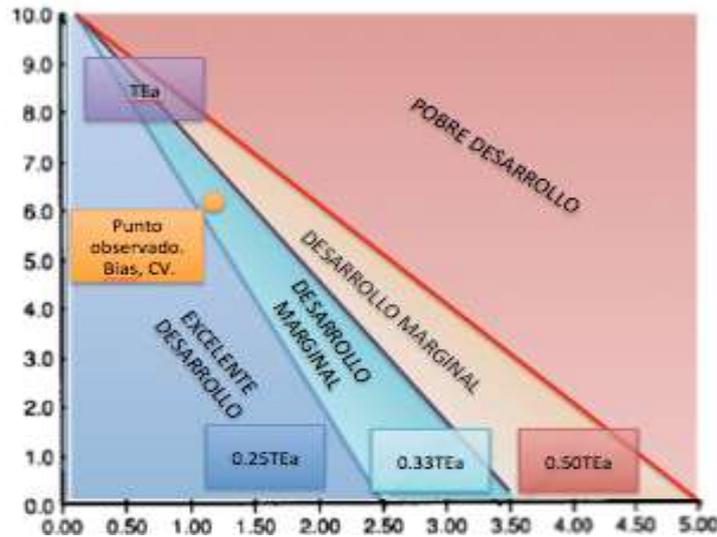


Figura 3. Gráfico MEDx (Westgard, 1995).

11. Estudios comparativos del rendimiento de equipos hematológicos en veterinaria.

Una vez hemos definido el *modus operandi* para la comparación de técnicas y equipos a nivel laboratorial, nos centraremos en los trabajos publicados de comparación entre analizadores hematológicos en veterinaria. Se ha de tener en cuenta que existen marcadas incongruencias entre la nomenclatura utilizada en cada uno de estos trabajos, así como en la metodología estadística utilizada. También hay que considerar que los trabajos más exhaustivos (aquellos que han comparado multitud de analizadores con diversas tecnologías cada uno) suelen referirse a pequeños animales, siendo las publicaciones en equinos mucho más limitadas (e inexistentes las referidas a burros).

En caninos, uno de los estudios más concienzudos publicados en hematología veterinaria comparó los resultados de contajes manuales, equipos basados en técnicas de centrifugación (QBC VetAutoread de Idexx), equipos de impedancia (CBC-Diff de Heska y HemaVet 950), el equipo LaserCyte y el Advia 120, considerando este último como *gold standard* (Welles *et al.*, 2009), salvo en el caso del recuento diferencial leucocitario (para el que se utilizó un contaje sobre 100 células). En este trabajo se realizó

una comparativa mediante regresión lineal con el método de mínimos cuadrados, se estudiaron gráficamente los *plots* con el sistema de Bland-Altman, calculándose igualmente la denominada “equivalencia diagnóstica” (para la cual se consideraron datos sobre/subestimados aquellos fuera del rango de media \pm 20% de la media).

El equipo de centrifugación mostró buenas correlaciones con los datos del Advia 120, aunque baja exactitud para WBC (mostrando una continua sobrestimación respecto al Advia 120). Tanto PLT como HCT mostraron excelentes correlaciones y comparabilidades entre ambos equipos, si bien se observó subestimación del HCT (2-3%) con el VetAutoread (hay que considerar que el mismo determina PCV, y no HCT). Respecto a los leucocitos, la técnica de centrifugación mostró de escasa a nula fiabilidad (comparándose con el Advia 120 y el contaje manual) y los resultados mostraron marcadas sobrestimaciones (para eosinófilos y linfocitos+monocitos) así como correlaciones de pobres a nulas (Welles *et al.*, 2009).

Respecto a los equipos de impedancia, mostraron de excelentes a buenas correlaciones con los resultados del Advia 120 para WBC, HCT y PLT, siendo la exactitud de buena a media para estos mismos parámetros. Al compararse las diferencias entre estos equipos y el Advia 120, se observó un error sistemático positivo constante (sobrestimación) para WBC en el Hemavet 950 y una subestimación de PCT en ambos equipos. En ambos analizadores, los resultados del hematocrito siempre fueron inferiores (2-3%) respecto a los del Advia 120. Tanto el MCV (Hemavet 950) como la MCHC (ambos) mostraron una escasa correlación y comparabilidad. Respecto a los leucocitos, el diferencial en 3 poblaciones realizado por el CBC-Diff Heska mostró excelentes correlaciones y fue comparable (tanto al Advia 120 como a los contajes manuales) respecto a los neutrófilos (granulocitos), siendo ambos parámetros buenos a moderados para los linfocitos y de poca comparabilidad (baja exactitud) para los monocitos. El diferencial en 5 poblaciones realizado por el Hemavet 950 resultó en excelentes (neutrófilos) a pobres (resto de poblaciones) correlaciones con el Advia y la técnica manual, siendo la comparabilidad buena para los neutrófilos, linfocitos y monocitos, pero escasa (Hemavet 950 mostró una continua sobrestimación) para eosinófilos y basófilos.

En cuanto al rendimiento del LaserCyte en muestras caninas, se observaron excelentes correlaciones en cuanto a WBC, HCT y PLT respecto al Advia, si bien se

detectaron subestimaciones en WBC. El hematocrito también fue subestimado (3-4%) por LaserCyte, así como las plaquetas y los reticulocitos. MCHC no mostró buena correlación ni comparabilidad. De entre las cinco poblaciones leucocitarias, únicamente los neutrófilos mostraron buena fiabilidad (entendida como buena correlación y comparabilidad con los contajes manuales y el Advia 120), mientras que los linfocitos y eosinófilos fueron subestimados y los monocitos y basófilos sobrestimados (Welles *et al.*, 2009).

Por último, el propio Advia 120 fue estudiado de forma comparativa con los contajes diferenciales manuales. En este caso, tanto los porcentajes de neutrófilos, linfocitos como de eosinófilos mostraron buenas exactitudes, si bien los monocitos también fueron sobrestimados (Welles *et al.*, 2009).

En conclusión, en este estudio canino se observó que los equipos de impedancia mostraban mayor fiabilidad (correlación y exactitud respecto al Advia 120 y método manual) que LaserCyte y los equipos de centrifugación (siendo el VetAutoread el equipo menos fiable). De entre todos los parámetros hemáticos, el diferencial leucocitario fue el que menor fiabilidad y transversalidad mostró entre distintos equipos y únicamente el porcentaje de neutrófilos (o granulocitos) se estimó adecuadamente, apareciendo marcados y llamativos fallos en los contajes de monocitos y basófilos.

Otro trabajo exhaustivo testó el rendimiento de 9 equipos en pequeños animales (equipo de centrifugación: Vet Autoread; equipos de impedancia: MS45, Heska CBC, Scil Vet ABC, VetScan; y equipos más avanzados: LaserCyte, ForCyte, CELL-DYN 3500 y ADVIA 120), utilizando como referencia los resultados del Advia 120, salvo para el HCT, cuyo *gold standard* fue el obtenido mediante centrifugación (Becker *et al.*, 2008). Los autores de este artículo también analizaron los *plots* según Bland-Altman y estudiaron los resultados mediante regresión lineal, regresión DEMING y Passing-Bablok según las características de los datos obtenidos.

En este trabajo se detectó una muy buena linealidad para la hemoglobina en todos los equipos, así como para los leucocitos (excepto Scil Vet ABC), eritrocitos y contajes plaquetarios. Los coeficientes de variación fueron bajos para la mayoría de parámetros, salvo en el caso de los contajes plaquetarios (4,4-9,2%). Al estudiarse el efecto *carry*

over, el mismo fue prácticamente descartable en todos los equipos y parámetros (Becker *et al.*, 2008).

Becker también realizó un estudio de sensibilidad y especificidad de las alertas mostradas por cada uno de estos equipos, hallando que el analizador Heska marcó hasta el 89% de los contajes plaquetarios felinos (claramente debido a un error en la identificación de las mismas en esta especie). El CELL-DYN también marcó un elevado porcentaje de muestras debido a diferencias entre los contajes leucocitarios obtenidos por las dos técnicas que realiza este equipo (impedancia y láser). En el caso del Advia 120, el 33% de las muestras también mostró algún tipo de alerta. Debido a los amplios porcentajes de alertas mostrados, los autores no realizaron un estudio más profundo de las mismas y se limitaron a concluir que es necesaria una revisión (aunque sea mínima) visual de todas las muestras, debido a la escasa fiabilidad del sistema de alerta de todos los equipos analizados (Becker *et al.*, 2008).

Respecto a la exactitud de cada equipo (comparando los parámetros con el Advia 120 a excepción del HCT), se detectaron las siguientes incongruencias:

- El equipo de centrifugación subestimó la hemoglobina de forma sistemática y sobrestimó ligeramente el contaje leucocitario.
- -El equipo Vet Scan mostró sobrestimaciones muy marcadas en el HCT y MCV en ambas especies, así como en los contajes plaquetarios felinos.
- El CELL-DYN mostró sobrestimación del HCT, RBC y MCV en felinos.
- ForCyte sobreestimó RBC en ambas especies.
- Heska CBC mostró elevados RBC respecto al Advia 120.
- El equipo MS45 sobrestimó los contajes eritrocitarios felinos y subestimó la concentración de hemoglobina en ambas especies.
- El analizador de Scil Vet ABC mostró desviaciones constantes del RBC felino (produciendo resultados inferiores a los obtenidos con Advia) y subestimó igualmente los contajes plaquetarios.
- LaserCyte prácticamente produjo resultados idénticos a los obtenidos con el Advia 120 para la mayoría de parámetros, si bien se observaron un ligero error al azar (imprecisión) a nivel de RBC.

Llamativamente, los contajes leucocitarios (WBC) presentaron una muy elevada correlación entre equipos, sin que se identificaran sobre/subestimaciones entre los resultados del Advia 120 y los obtenidos (salvo para el equipo de centrifugación). Esta “transversalidad” de los equipos respecto al leucograma en pequeños animales y su alto grado de exactitud al compararse con métodos de elevada fiabilidad asegura que la interpretación del mismo se puede realizar de forma segura en todos estos equipos (Becker *et al.*, 2008). El problema de sobrestimación del equipo de centrifugación respecto a WBC ya había sido descrito con anterioridad en veterinaria (Bienzle *et al.*, 2000). Sorprendentemente, en este trabajo, no se calcularon los errores presentes para los diferenciales leucocitarios.

Respecto al error (sistemático y constante para todos los equipos) relacionado con el hematocrito, Becker propuso la elaboración de rangos de referencia específicos para cada equipo, pues probablemente se deba a la existencia de problemas de software y calibración en todos los equipos nombrados. Los valores de dicha desviación rondaron el 5-7% y fueron similares a los previamente descritos en otro trabajo en caninos (Dewhurst *et al.*, 2003). No obstante, el mayor problema respecto al hematocrito reconocido por este trabajo fue la presencia de baja precisión (elevados CVs, elevados errores al azar) en la mayoría de equipos. Estos elevados CVs se achacaron a variaciones en la morfología de los eritrocitos entre animales sanos y enfermos. En última instancia, Becker concluyó aconsejando que se comprueben los valores de HCT en cualquier equipo midiendo el PCV o calculándolos en base a $Hb \times 3$.

En cuanto a los contajes plaquetarios, hasta el 25% de las muestras provenientes de pacientes con severa trombocitopenia no fueron detectados por ningún equipo, lo cual pone de manifiesto la gran dificultad que tienen todos los analizadores automáticos para el contaje de estos elementos (máxime en ciertas especies, como el gato).

Sería destacable en este trabajo que el grado de precisión (la medida de error al azar) se mostró para la mayoría de parámetros fuera de lo aceptable para muestras humanas según los requerimientos de Westgard (Westgard, 1999). No obstante, la precisión de los equipos (y del Advia 120 en particular) sí que fue similar a estudios previos en veterinaria (Clark *et al.*, 2002).

En cuanto al LaserCyte, la ligera imprecisión del RBC en este equipo ya había sido también reportada previamente (Weissert *et al.*, 2008). Una de las hipótesis existentes para explicar la presencia de este error al azar en este equipo sería la presencia de un fallo inherente a la tecnología láser como, por ejemplo, pequeñas fluctuaciones en el nivel de ruido de fondo del láser que son inevitables a esta tecnología (Wenger-Riggenbach *et al.*, 2006; Becker *et al.*, 2008).

En otro estudio en pequeños animales (gatos y perros), comparando los resultados del diferencial manual con los del LaserCyte (Papasouliotis *et al.*, 2006), se observaron diferencias significativas (falta de exactitud, errores sistemáticos) en los porcentajes de neutrófilos y monocitos (ambas especies) así como de eosinófilos felinos. Al estudiar los resultados con el método de Bland-Altman, se observó subestimación de los neutrófilos para ambas especies (-10%), buena estimación de los linfocitos y eosinófilos, pero sobrestimación de los monocitos (+6-7%). En este trabajo los basófilos no se estudiaron debido a su elevada variabilidad. Cuando se caracterizaron los errores presentes, únicamente se detectó la presencia de un error constante en el caso de los eosinófilos felinos, sin que se observasen errores proporcionales. Estos hallazgos, comparables a los obtenidos con otros equipos basados de tipo láser más antiguos, como el Technicon H-1E de Miles Diagnostics (Tvedten y Haines, 1994), podrían explicarse por una confusión del equipo al caracterizar neutrófilos como monocitos. Este mismo problema fue ya propuesto por los investigadores caracterizando el anteriormente citado Technicon (Tvedten y Haines, 1994; Tvedten y Korcal, 1996). Otra característica llamativa respecto al rendimiento del LaserCyte fue la gran cantidad de muestras cuyo diferencial fue etiquetado como “erróneo” (indicando el propio equipo la necesidad de comprobar los resultados mediante contajes manuales), correspondiéndose a 28 de las 86 muestras totales (32.6%). Interesantemente, el análisis estadístico no mostró variaciones cuando dichas muestras fueron excluidas. Este porcentaje es similar al obtenido con otros equipos, como el 22% de muestras etiquetadas por el Cell-Dyn 3500 (Reagan, 1999).

También en pequeños animales, la precisión de LaserCyte se ha cifrado en 3,9% (CV) para RBC, 3-9,5% para WBC, 3,9-6,5% para contaje de neutrófilos, 7-17,9% para linfocitos, 4,9-13,1% para monocitos, 10,4-32,1% para eosinófilos, 7,8-32% para basófilos y 3,1-13,2% para contajes plaquetarios (Wenger-Riggenbach *et al.*, 2006). Como se puede observar, los CV de los contajes leucocitarios y plaquetarios son muy

elevados en este equipo y sobrepasan en gran medida las directrices (tanto veterinarias como humana) que determinan los TEa en hematología (Rishniw y Pion, 2016). En el trabajo de Wenger-Riggenbach, el LaserCyte demostró una elevada linealidad, salvo en el caso de los eosinófilos y basófilos (por su bajo contaje inicial). Al compararse (exactitud) con los resultados del Cell-Dyn 3500, mostró elevadas correlaciones ($r > 0,9$) para RBC, HCT, Hb, MCV, WBC y neutrófilos; siendo moderadas para los contajes plaquetarios ($r = 0,86$) y pobres para los linfocitos y monocitos (0,77), eosinófilos (0,29) y basófilos (0,03).

Siguiendo con los trabajos realizados en pequeños animales, un reciente estudio (Rishniw y Pion, 2016) realizó una profunda y exhaustiva validación en muestras caninas de 8 analizadores hematológicos (equipos de impedancia: Abaxis VetScan HM2, Abaxis VetScan HM5 y HemaTrue de Heska así como equipos con tecnología láser y modificaciones de la misma: XT2000i de Sysmex, Cell-Dyn 3500 de Abbott, Procyte y LaserCyte de IDEXX). En todos los equipos los autores observaron una desviación mayor que la imprecisión, siendo este un error sistemático proporcional. Sólo seis de los citados equipos cumplieron con los TEa propuestos por los propios autores (si bien, probablemente para evitar problemas comerciales, no se detallan qué equipos fueron). No obstante, sólo en el 30% de las mediciones (combinando equipos y todos los parámetros) se obtuvo un valor sigma mayor a 6 (con hasta el 39% de las mediciones mostrando sigmas bajo 3). En aquellas mediciones que no cumplieron con el valor sigma, se calculó el QGI, observándose que el 68% de los fallos eran atribuibles a la inexactitud, el 17% a la imprecisión y el 15% a ambas. Estos autores también determinaron si las mediciones presentaban “suficiente nivel de calidad para el uso en clínica veterinaria”, basándose en valoraciones subjetivas y llegando a la conclusión de que pocos analizadores pueden determinar correctamente los diferenciales de subpoblaciones leucocitarias en veterinaria. Por ello siguen recomendando realizar frotis sanguíneos y comprobar las fórmulas diferenciales cuidadosamente. Otra conclusión de este trabajo es que, al presentar cada analizador una desviación diferente en analitos específicos, el laboratorio debería realizar rangos de referencia específicos atendiendo a dicho analizador.

Por último, también en 2016, un trabajo de meta-análisis determinó la relación entre el error total observado en varios estudios publicados en pequeños animales y los TEa propuestos por un panel de expertos (Cook *et al.*, 2016). En este trabajo se usaron datos

de otras publicaciones previas que habían utilizado equipos como el Advia 120, CellDyn 3500, XT2000iV de Sysmex (validándose igualmente el Advia 2120). En general, se observó que los TEa propuestos por los expertos hematólogos veterinarios fueron mayores a los previamente reportados en medicina humana. No obstante, incluso con esos mayores niveles de errores aceptables, los errores totales fueron superiores a los TEa para la mayoría de subpoblaciones leucocitarias (a excepción de los neutrófilos), los contajes plaquetarios felinos y la medición de Hb en la mayoría de equipos. Los valores de sigma variaron según el estudio y equipo utilizado, si bien en la mayoría de las ocasiones la causa de la falta de rendimiento de los analizadores se debió a errores sistemáticos (atendiendo al QGI) (Cook *et al.*, 2016).

Aunque la mayoría de estudios citados utilizan el Advia 120 como *gold standard* para realizar la comparativa de otros equipos, hemos de destacar que el mismo sí que ha demostrado errores al compararse con otras técnicas. Así, por ejemplo, en muestras de fluidos cavitarios en equinos, Advia 120 sobreestimó los contajes celulares de forma sistemática respecto a los contajes manuales realizados (Gorman *et al.*, 2009).

En caballos el rendimiento del Advia 120 ha sido comparado con el de los contajes manuales y con un equipo de impedancia (Hemat 8, de la empresa Seac) (Giordano *et al.*, 2008). El hematocrito, en ambos equipos, mostró un error sistemático continuo y positivo (sobreestimación) respecto al PCV. El equipo de impedancia tuvo una elevada exactitud respecto a RBC y Hb, si bien los contajes plaquetarios y el WBC fueron superiores en el mismo respecto al Advia 120. La exactitud fue baja en el equipo de impedancia para el MCV, lo cual ha sido explicado por una tendencia de estos equipos a sobreestimarlo cuando el eje del eritrocito no está alineado con el eje de lectura del flujo o cuando aparecen microagregados de 2-3 eritrocitos (Mohandas *et al.*, 1986). Al compararse los resultados de los diferenciales manuales con los del Advia, todas las poblaciones mostraron cambios significativos (Advia detectó mayores porcentajes de neutrófilos, monocitos, eosinófilos y basófilos y menores porcentajes de linfocitos) y la exactitud fue pobre para todas ellas, a excepción de neutrófilos y linfocitos (Giordano *et al.*, 2008). Los CVs del Advia fueron marcadamente bajos (<1%, elevada precisión) y, por tanto, dentro del rango exigido (TEa) en hematología veterinaria (Rishniw y Pion, 2016), para todos los parámetros excepto los contajes diferenciales leucocitarios. Respecto a la sobreestimación de neutrófilos e infravaloración de linfocitos, los autores lo explicaron

por un cambio artefactual por la conservación de la muestra, que podría provocar la reducción en la densidad cromatínica y citoplasmática, dando lugar a confusión entre ambas poblaciones (Giordano *et al.*, 2008).

En caballos también se ha publicado la validación del ProCyte de IDEXX (Goldmann *et al.*, 2013), utilizándose como *gold standard* tanto el diferencial manual como los resultados del Advia 120. Este analizador mostró alta precisión, con CVs bajo el 10% a excepción de los contajes plaquetarios, siendo también excelente la linealidad y la exactitud (excepto para MCHC, los contajes plaquetarios y el diferencial de monocitos).

Otro equipo con un estudio detallado de validación en caballos es el XT-2000iV de Sysmex (Bauer *et al.*, 2011; Bauer *et al.*, 2012). En ambos trabajos se utilizó el Advia 2120 como *gold standard*. La precisión del mismo fue elevada, con CVs intra-ensayo menores al 2% excepto para los contajes plaquetarios y porcentajes diferenciales de leucocitos. La precisión inter-ensayo fue más elevada en todos los parámetros. Tanto la linealidad como el *carry over* en este analizador fueron excelentes, siendo la exactitud del mismo de buena a excelente en caballos (Bauer *et al.*, 2011). En cuanto a los contajes diferenciales (utilizando como *gold standard* el contaje manual), el equipo de Sysmex mostró en caballos una desviación negativa para neutrófilos y eosinófilos y positiva para monocitos y linfocitos, siendo la correlación muy pobre para los monocitos (Bauer *et al.*, 2012). Estos resultados ponen de nuevo de manifiesto la necesidad de comprobar los diferenciales en equinos realizando un contaje diferencial manual.

También existen trabajos de validación y comparación de equipos de impedancia en caballos, normalmente centrados (los más actuales) en equipos con mayor rendimiento que los primeros comercializados en medicina veterinaria. Así, por ejemplo, un trabajo en varias especies, incluida el caballo (Wassmuth *et al.*, 2011) comparó los resultados del Mythic 18 de Orphée con los del Sysmex XT-2000iV, PVC (estándar para el HCT) y contaje manual diferencial de leucocitos. En equinos se detectó una excelente correlación y pequeñas inexactitudes en parámetros eritroides (salvo RCDW y MCHC), así como marcada fiabilidad del WBC y contaje granulocítico y linfocitario (excelente fiabilidad del diferencial en 3 poblaciones). La precisión de este equipo fue excelente, demostrando unas elevadas capacidades para un instrumento basado únicamente en la impedancia (Wassmuth *et al.*, 2011). También en caballos, otro equipo de impedancia – el Sysmex

pocH-100Iv- demostró buena correlación y exactitud respecto al Cell-Dyn 3500, el hematocrito manual y el diferencial manual leucocitario, si bien en este último caso el equipo frecuentemente no diferenció entre granulocitos y monocitos (Riond *et al.*, 2011).

Por último, y en vista de que la mayoría de equipos presentan fallos y baja exactitud para el conteo diferencial leucocitario, en medicina humana se está investigando en los últimos años las correlaciones entre los resultados obtenidos con analizadores hematológicos típicos y los de equipos como el CellaVision DM96 (Briggs *et al.*, 2009). Este trabajo muestra que ambos resultados son totalmente equiparables, con la ventaja de la rapidez que implica el sistema automático.

En conclusión, existen numerosos estudios de validación y comparación de analizadores hematológicos en pequeños animales, siendo los mismos mucho más escasos en caballos. En la actualidad no existen publicaciones de este tipo específicas para el burro.

CAPITULO 3. DIFERENCIAS ENTRE BURROS Y CABALLOS.

Tanto los burros como los caballos pertenecen al género *Equus*, el cual forma parte de la subfamilia *Equinae* y la familia *Equidae*, dentro del orden de los Perisodáctilos. Dentro del género *Equus* se incluyen los caballos, burros y las cebras, estableciéndose varios subgéneros en los que se incluyen numerosas especies a su vez (Figura 4). Según la nomenclatura científica actual los asnos están encuadrados en el subgénero *Asinus* y, más concretamente en la especie *Equus asinus*. Por otro lado, los caballos se engloban dentro del subgénero *Caballus*, y específicamente en la especie *Equus caballus* (Groves y Grubb, 2011). Existen numerosas razas de asnos en todo el mundo. En España cabrían destacar como razas internacionalmente reconocidas el burro Andaluz, el Mallorquín, el Catalán, el Zamorano-leonés y el burro de las Encartaciones, si bien existen esfuerzos para el reconocimiento de otras razas.



Figura 4. Clasificación filogenética del género *Equus*. Tomado desde Groves y Grubb, 2011.

Burros y caballos son las especies de équidos más numerosas en España, computando la cantidad de cerca de 700.000 animales censados en el año 2010 según la OIE (datos de WAHID). No obstante, y a pesar de su cercanía filogenética, cada subgénero se define por tener características propias. Así, hemos de resaltar que la distancia filogenética entre caballos y burros dista poco de la presente entre caballos y cebras (*Equus zebra*), las cuales también pertenecen al mismo género, pero dentro de un subgénero diferente.

El estudio sistemático de las diferencias entre burros y caballos se remonta a mediados del siglo XX, si bien aspectos más fácilmente evaluables como idiosincrasias anatómicas o de comportamiento han sido conocidas desde la antigüedad. A continuación, se describen las principales diferencias reportadas entre burros y caballos hasta el momento.

1. Diferencias genéticas.

El burro doméstico cuenta con 62 cromosomas, en tanto en cuanto el caballo cuenta con 64. Los híbridos (mulos) presentan un total de 63 cromosomas, siendo ambos tipos de cruces (caballo macho x asno hembra y yegua x asno macho) considerados estériles, si bien existen reportes esporádicos de mulas que han tenido descendencia. (Ryder *et al.*, 1985; Rong *et al.*, 1988). Se considera que ambos équidos compartieron un ancestro común hace más de 1.9-2.3 millones de años (Kiguwa *et al.*, 2000). A pesar de que ambas especies únicamente se diferencian en un par de cromosomas, existen diferencias importantes en el número de brazos de los mismos y el patrón de bandas cromosómicas (Ryder *et al.*, 1978). Estos hallazgos indican que la diferencia en los cariotipos es mucho más profunda que la simple ausencia de un par de cromosomas. En los últimos años, se han utilizado sondas específicas para determinar la homología entre ambas especies, observándose un alto grado de reordenamiento de genes, el cual podría ser el responsable de la típica esterilidad de los cruces (Yang *et al.*, 2004). Igualmente, se ha comprobado que las diferencias genéticas abarcan incluso al ADN mitocondrial, herramienta que puede ser útil para la diferenciar la carne de ambas especies (Zhao *et al.*, 2005).

De igual forma, también se han estudiado las diferencias en el proteoma sérico entre ambas especies, observándose profundos cambios entre los perfiles de caballos, burros y mulos (Henze *et al.*, 2011). Este hallazgo podría hacer pensar que también existe una distinta regulación post-transcripcional de la información genética que podría explicar en parte las características de cada especie. De hecho, las diferencias a nivel proteico entre ambas especies son tan extensas que incluso la hemoglobina difiere considerablemente (Balasundaresan *et al.*, 2006).

2. Diferencias morfológicas y anatómicas.

Morfológicamente se trata de animales que presentan una cabeza muy ruda, alargada, orejas de gran tamaño seguidas de un cuello corto sin crines abundantes. Los pechos son estrechos por lo que las extremidades anteriores aún se encuentran más próximas entre ellas. La cruz es poco destacada continuándose con un dorso ascendente. La grupa normalmente es corta y algo derribada, de la que nace una cola pobre en crin y delgada (Svendsen, 1997). El asno también se caracteriza por su típico rebuzno, siendo el mismo un sonido grave muy característico y diferente al relincho de un caballo.

Los caballos, por su parte, se encuadran dentro de un subgénero caracterizado por tener una cabeza fina, orejas medianas y cuello alargado. Los pechos son más anchos que en los asnos y las extremidades alargadas. La cruz en mayor o menor medida es destacada y se continúa con un dorso tendente a la rectitud para continuar luego con una grupa más redondeada. El nacimiento de la cola puede ser variable según la raza de la que se trate. Igualmente, la cantidad de crin que suele aparecer en la cola de un caballo en comparación con los asnos es mucho mayor (Svendsen, 1997).

De forma más específica, también existen diferencias en la estructura laríngea, en la musculatura del cuello a nivel de la zona de las venas yugulares, el sacro ó el conducto nasolacrimal (Shoukry *et al.*, 1975; Said *et al.*, 1977; Lindsay y Clayton, 1986). Otras diferencias morfológicas a reseñar serían la falta de pelaje largo a nivel de la frente, mayor prominencia de las cernejas ó presencia de pezones en machos (Burnham, 2002).

El casco del burro suele ser de menor tamaño y con unas paredes más gruesas, así como un ángulo menos agudo que el caballo. Estas diferencias a nivel podal han sido validadas por radiología, llegándose a la conclusión de que es erróneo extrapolar ángulos y mediciones típicamente usadas para el casco del caballo en asnos (Collins *et al.*, 2011).

De igual forma, genéricamente los burros presentan una menor altura a la cruz y un manubrio del esternón más prominente, siendo igualmente la pelvis distinta en los ángulos óseos. Así mismo, la mandíbula presenta un hueso más grueso y denso, siendo menor el espacio intermandibular que en caballos (Burnham, 2002).

Los dientes son también distintos entre ambas especies, al menos respecto a la fecha de erupción (Burnham, 2002). Tradicionalmente se ha creído que los burros eran más

longevos que los caballos (hasta 45 años). No obstante, esta diferencia en la erupción dentaria complica la determinación fiable de la edad en esta especie, pues no se obtienen datos fiables al usar metodologías propias de caballo y es por ello por lo que se hace necesario utilizar una técnica específica (Muyllé *et al.*, 2002). Por otro lado, también se ha confirmado que las patologías dentales son más frecuentes en burros que en caballos, destacando la aparición de dientes de lobo y un desgaste desigual (Du toit *et al.*, 2008).

También se han hallado diferencias a nivel del aparato reproductor entre ambas especies. Así, el cuello cervical de la burra es de menor diámetro y más largo que el de la yegua y protruye más eminentemente en la vagina del animal presentando además pliegues vaginales dorsales y ventrales que impiden el paso al mismo (Vendramini *et al.*, 1998). Los ovarios suelen aparecer en una posición más craneal en las burras, las cuales también muestran un mesosálpinx más ancho que las yeguas (Renner-Martin *et al.*, 2009).

3. Diferencias fisiológicas.

Al igual que las diferencias a nivel morfológico también existen características específicas fisiológicas de gran relevancia entre ambas especies. A consecuencia de una fisiología distinta, numerosos valores clinicopatológicos y laboratoriales en general son diferentes entre burros y caballos.

En este sentido hay que destacar las diferencias apreciadas en el medio interno, bioquímicas, endocrinas, metabólicas, inmunológicas, reproductivas y comportamentales.

Respecto a la actividad eléctrica cardíaca, se han demostrado importantes diferencias entre ambas especies mediante el uso de electrocardiografía. Así pues, en un estudio sobre burro Zamorano-leonés (Escudero *et al.*, 2009) se observaron amplias diferencias tanto en la amplitud de las ondas, morfología como en la duración de los intervalos.

Es importante destacar que, en esta especie, al igual que ocurre en rumiantes, el intestino delgado se constituye como un importante reservorio de agua (Kasirer-Izraely

et al., 1994), lo cual permite una mayor adaptación ante condiciones adversas que conllevan cierto grado de deshidratación (Yousef *et al.*, 1970).

A nivel bioquímico, la concentración de bilirrubina sérica suele ser inferior respecto a los datos de caballos, mientras que los valores de triglicéridos, creatina kinasa y gamma glutamil transpeptidasa suelen ser superiores en burros (Straub *et al.*, 1977; Zinkl *et al.*, 1990).

Respecto a la bioquímica, existen evidencias de la influencia del sexo y la edad sobre los valores de la misma. Así pues, las burras muestran valores superiores de calcio sérico, glucosa, sodio y potasio mientras que en los machos los niveles de colesterol y fósforo son más altos (Nayeri, 1978). Por su parte, animales más jóvenes muestran valores inferiores de glucosa, fósforo y potasio y valores superiores de proteínas plasmáticas y globulinas respecto a animales de mayor edad (Zinkl *et al.*, 1990). También se ha demostrado un efecto racial, mostrando los asnos miniatura niveles superiores de lactato deshidrogenasa respecto a otras razas (Zinkl *et al.*, 1990).

Por último, también se ha observado un diferente proteinograma entre animales de ambas especies. De forma específica, la división de las beta-globulinas, evidente en caballos, suele faltar tanto en mulos como en burros (Bonnadonna *et al.*, 1967).

A nivel endocrino, se han constatado variaciones en la concentración y actividad de numerosas hormonas entre ambas especies. Así, por ejemplo, la gonadotropina coriónica del asno muestra una actividad más cercana a la de la LH que a la de la FSH, al contrario que en equinos donde su actividad es combinada (Rosers *et al.*, 1984). También se han observado diferencias en otros factores como el factor de crecimiento parecido a la insulina (*Insulin-like growth factor*), que muestra fracciones distintas entre ambas especies (Prosser y McLaren, 1992). En lo que concierne al eje hormonal pancreático, los test de tolerancia a la glucosa vía oral también arrojan resultados dispares entre ambas especies, permaneciendo la glucemia elevada durante más tiempo en los burros (June *et al.*, 1992). De igual forma se ha observado que la concentración sérica de insulina es menor en burros que en caballos (Dugat *et al.*, 2010). En cuanto al eje hipotálamo-hipófisis-adrenales, el mismo estudio afirma que los niveles de ACTH de burros son mayores a los de caballos aún cuando el cortisol es similar en ambas especies (Dugat *et al.*, 2010). El estudio más reciente que ha abordado estas diferencias endocrinológicas se

ha centrado en el eje tiroideo, demostrando que la concentración de la mayoría de estas hormonas (tiroxina libre y total, triiodotironina libre y total, así como triiodotironina reversa) es mayor en burros respecto a caballos (Mendoza *et al.*, 2012).

A nivel inmunológico, se ha puesto de manifiesto la presencia de un aloantígeno específico en los glóbulos rojos de asnos y mulos que no se halla en eritrocitos de caballo (McClure *et al.*, 1994). Esta característica conlleva a los autores a hipotetizar que todos los mulos descendientes de una yegua podrían presentar una tendencia congénita a sufrir isoeritrolisis neonatal.

En cuanto a la reproducción, el periodo de gestación es distinto entre ambas especies, con una media de 335-346 días en el caso de la yegua frente a la media de 365-370 días en la burra (Burnham, 2002). A pesar de ello, se ha demostrado que la burra puede finalizar la gestación de un embrión de caballo implantado en fases tempranas (Allen *et al.*, 2010), lo cual expande una nueva vía de aprovechamiento de estos animales para actuar como receptoras de donantes equinas de alto valor. Por otro lado, en la actualidad existen numerosos estudios en los que se persigue mejorar la calidad seminal de los asnos valorando el efecto de diferentes diluyentes (Mello *et al.*, 2000; Cottorello *et al.*, 2002; Serres *et al.*, 2002; Rota *et al.*, 2008; Miro *et al.*, 2009; Vidament *et al.*, 2009; Contri *et al.*, 2012) y temperaturas de refrigeración (Serres *et al.*, 2002; Gomez-Cuetara, 2004) sobre la calidad seminal.

En el campo del comportamiento, y centrándonos en aquellas investigaciones que han testado valores objetivos del mismo.

En el medio natural y debido al entorno del que es originario el asno (zonas áridas y desérticas) define la estructura social de esta especie. En estos lugares donde los recursos como el agua y la comida son raros, el asno, se ha adaptado a vivir en muy pequeños grupos de uno u dos individuos, uniéndose únicamente para procrear, a diferencia de los caballos que viven en manadas (Klingel *et al.*, 1977). Por otro lado, los machos suelen proteger un territorio que posee alimento y/o agua, siendo un reclamo para las hembras y aumentando así las posibilidades de reproducción del macho importante diferencia con respecto los caballos (Woodwards *et al.*, 1979). Estas diferencias conductuales son la base de las diferencias comportamentales que existen entre el asno y

el caballo con el resto de especies. Así podemos observar como el asno domestico puede agredir a otras especies animales, incluido al hombre, si éste percibe que su territorio es invadido, todo lo contrario que los caballos que siempre tenderán a huir (Burden and Trawford, 2006). Este carácter ha sido usado para aprovechar al asno como guardián de ganado, protegiéndolo de depredadores como lobos y zorros, así como un elemento clave a conocer para el manejo y educación de esta especie (Walton *et al.*, 1989).

Otro de las características destacables e importante en la clínica de estos de los asnos, es su estoicidad. Algunos autores han estudiado la respuesta al dolor del asno, llegando a la conclusión que la evaluación y valoración del dolor en esta especie es más difícil que en caballos pues existe una menor cantidad de signos clínicos, siendo los que aparecen mucho más sutiles (Ashley *et al.*, 2005; Olmos *et al.*, 2011). Este hecho ha sido ratificado recientemente por Grint *et al.*, (2015) quién a través del estudio de diferentes parámetros fisiológicos, incluida la electroencefalografía, demostró que un mismo estímulo doloroso desata una respuesta fisiológica similar en caballo y asnos.

4. Diferencias farmacológicas y terapéuticas.

Hasta la actualidad la dosificación de fármacos para los asnos se hace de una forma empírica y utilizando dosis establecidas para caballos en la mayoría de los casos. La administración de fármacos en los burros se hace mediante un uso extra-etiqueta, pues la gran mayoría no recogen explícitamente su uso en esta especie, sí estando indicados para caballos. Como se ha venido comentando, las numerosas diferencias fisiológicas, metabólicas e incluso anatómicas pueden alterar la farmacocinética y farmacodinamia de los fármacos, dando lugar a un efecto ó respuesta que puede variar entre ambas especies. Es por ello por lo que, además de ser necesario un estudio comparativo para determinar los intervalos de referencia laboratoriales del burro, sería necesario profundizar en los conocimientos farmacológicos asociados a esta especie, evitándose así posibles reacciones adversas o fallos en la dosificación y/o eficacia. En Tabla 6 se recogen las dosis e intervalos de dosificación indicadas para asnos según la bibliografía existente.

Tabla 6. Dosis y pautas terapéuticas recomendadas de los fármacos más comúnmente administrados en burros.

FÁRMACO	Dosis recomendada en burros	Referencia
Fenilbutazona	2,2 – 4,4 mg/Kg IV ó PO q 12 h en adultos q 8 h en asnos miniatura	Matthews <i>et al.</i> , 2001 Mealey <i>et al.</i> , 1997 Cheng <i>et al.</i> , 1996a
Ketoprofeno	1-2,2 mg/Kg/IV	Oukessou <i>et al.</i> , 1996
Flunixin megumine	1,1 mg/Kg/IV q 12-24 h	Cheng <i>et al.</i> , 1996b Coakley <i>et al.</i> , 1999
Meloxicam	0,6 mg/Kg/IV q 24 h	Sinclair <i>et al.</i> , 2006
Carprofeno	0,7 mg/Kg/IV q 24 h	Mealey <i>et al.</i> , 2004
Gentamicina	2,2 mg/Kg/IV q 8 h	Welfare <i>et al.</i> , 1996
Amikacina	6 mg/Kg/IV q 6 h	Horspool <i>et al.</i> , 1994
Oxitetraciclina	10 mg/Kg/IV q 24 h	Horspool y McKellar 1990
Penilicina sódica G	20.000 UI/Kg/IV q 4-6 h	Horspool y McKellar 1995
Amoxicilina	10-15 mg/Kg q 4-6 h IV ó IM	Oukessou <i>et al.</i> , 1994 Lavy <i>et al.</i> , 1995a
Ampicilina	10 mg/Kg/IV q 4-6 h	Horspool <i>et al.</i> , 1992
Sulfametazol/trimetropim	12 - 25 mg/Kg/IV q 8-12 h	Peck <i>et al.</i> , 2002
Danofloxacin	>1,25 mg/Kg/IV	Kum <i>et al.</i> , 2009
Marbofloxacin	2 mg/Kg/IM q 24 h	Gonzalez <i>et al.</i> , 2007
Norfloxacin	10 – 20 mg/Kg/IM q 12-24 h	Lavy <i>et al.</i> , 1995b
Ivermectina	0,2 mg/Kg/PO	Trawford y Mulugeta, 2008
Fenbendazol	30 – 60 mg/Kg/PO 7,5 mg/kg/IV durante 5 días	Trawford y Mulugeta, 2008
Oxfendazol	10 mg/Kg/PO	Trawford y Mulugeta, 2008
Triclabendazol	12 mg/Kg/PO	Trawford y Mulugeta, 2008
Pamoato de pirantel	19 – 38 mg/kg/PO	Trawford y Mulugeta, 2008
Praziquantel	1 – 2,5 mg/Kg/PO	Trawford y Mulugeta, 2008

IV: intravenoso; PO: oral; IM: intramuscular; q: cada

En lo que respecta a los agentes antiinflamatorios, analgésicos y anestésicos existen amplias diferencias entre ambas especies. Los burros presentan un metabolismo hepático de algunos fármacos más rápido que los caballos. Por ejemplo, se ha demostrado que el metabolismo de la guaifenesina y de la fenilbutazona a nivel hepático ocurre en menor tiempo en burros en comparación con los caballos (Matthews *et al.*, 1997a; Mealey *et al.*, 1997). De forma concreta, el aclaramiento hepático de la fenilbutazona es hasta 10 veces superior en burros que en caballos (Lizarraga *et al.*, 2004). Esto significaría que para alcanzar una misma concentración plasmática de este fármaco deberíamos administrar hasta diez veces una dosis superior en burros respecto a caballos. Por contra, los burros necesitan dosis más bajas de flunixin meglumine, uno de los antiinflamatorios no

esteroides (AINEs) que con más frecuencia se utiliza en la clínica (Coakley *et al.*, 1999). También se ha puesto de manifiesto que otros AINEs como el meloxicam y el firocoxib tienen un tiempo de vida media más bajo en burros en comparación con los caballos (Sinclair *et al.*, 2006; Matthews *et al.*, 2009). De hecho, el corto tiempo de permanencia en plasma y escasa distribución sistémica del meloxicam en burros hacen que el uso de este fármaco sea de nula utilidad en esta especie (Sinclair *et al.*, 2006). También existen diferencias en los efectos de estos fármacos. Así, por ejemplo, se ha demostrado que tratamientos prolongados con antiinflamatorios no esteroides suponen un mayor riesgo de aparición de efectos tóxicos en burros (Kvaternick *et al.*, 2007) respecto a caballos.

Dentro del grupo de sedantes y anestésicos también se han demostrado diferencias entre las distintas razas de asnos debido a las distintas tallas (Matthews *et al.*, 2001 y 2002). En este sentido habría que destacar que el asno miniatura se caracteriza por necesitar dosis más altas que el resto de burros de tallas más grandes. En asnos también se ha estudiado la administración de alfa-2 agonistas, tales como la xilacina, detomidina y romifidina, observándose un efecto similar que en caballos. Al igual que en caballos, en burros también se pueden asociar los alfa-2 agonistas junto con opiáceos (butorfanol), obteniéndose el mismo resultado de sinergismo que el observado en equinos (El-Maghraby y Atta 1997; Matthews *et al.*, 1997b; Joubert *et al.*, 1999).

Los antimicrobianos son otro de los grupos de fármacos que con mayor frecuencia se administran en la clínica equina y en el que también existen diferencias entre ambas especies. Uno de los antibióticos más administrados en équidos son las sulfonamidas potenciadas con trimetoprim, pero en burros se ha demostrado que al igual que ocurre con las fluoroquinolonas, la frecuencia de administración al día ha de ser mayor en comparación con los caballos para alcanzar la misma concentración plasmática (Mandell y Petri, 1996; Peck *et al.*, 2002). No obstante, se desconoce el mecanismo metabólico detrás de esta idiosincrasia. En el caso de otros antibióticos, sí que se ha comprobado que la diferencia entre burros y caballos reside en un distinto aclaramiento hepático. Este caso se da en fármacos como la bencilpenicilina, ampicilina, amoxicilina y oxitetraciclina, sin que existan diferencias sin embargo a nivel de los aminoglucósidos (Toutain *et al.*, 2010). También se ha evidenciado que los burros tienen un mayor aclaramiento renal a nivel tubular del sulfametoxasol que los caballos (Peck *et al.*, 2002).

V. AIMS

The aims of this study were:

- a) To evaluate the hematological results obtained in a population of donkeys from Andalusia and characterize differences attending to gender or age.
- b) To compare hematological results from the LaserCyte analyzer, an impedance system and the manual method in samples from donkeys.
- c) To determine LaserCyte's accuracy, precision, linearity and other performance indexes in donkey blood.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Selección de los animales.

Para la realización de este trabajo se analizaron muestras sanguíneas procedentes de burros sanos y tomadas durante un programa de evaluación sanitaria realizado durante 4 años (2009-2012). Se analizaron muestras procedentes de diversas explotaciones de Andalucía, localizadas en Córdoba, Granada, Málaga, Huelva y Cádiz.

Para tomar muestras en dichas explotaciones, se desplazaron a las mismas el doctorando junto con el equipo de investigación, realizándose todo el estudio de inclusión previo, así como la toma de muestras por parte de personal veterinario ampliamente entrenado en el manejo de burros.

A cada animal se le realizó una lectura de microchip mediante un lector (Pocket Reader Ex Digital, Destron-Fearing, Langeskov, Dinamarca) y se comprobó su edad exacta gracias a la plataforma RAIA (Registro Andaluz de Identificación Animal) de la Junta de Andalucía (<https://www.raia.es/>). En el caso de animales con ausencia de identificación digital, la edad se estimó de acuerdo a lo anotado en el pasaporte veterinario vigente o bien por estudio de la edad según la boca (Muyllé *et al.*, 1999). Cabría destacar que en los burros la erupción de los incisivos (tanto deciduos como permanentes) es más tardía que en caballos, mientras que el desgaste de los permanentes es más temprano que en los caballos. Siguiendo las indicaciones de Muyllé y colaboradores, no se tuvieron en cuenta otros hallazgos como la evolución del surco de Galvayne, presencia de desgaste heterogéneo, etc.

Una vez comprobada la edad de los animales de forma fehaciente, se anotó la misma, al igual que la raza (Burro Andaluz, Burro Catalán, Burro Mallorquín, Burro Leonés-Zamorano, Burro Moruno, animal cruzado), el sexo (hembra/macho entero o garañón/macho castrado) y cualquier otra observación realizada y de interés durante la toma de constantes y examen físico.

Para la inclusión en este estudio se establecieron una serie de requisitos de forma previa que todos los animales testados habrían de cumplir, con el objetivo de realizar un estudio sobre animales sanos que no presentasen ninguna patología seria que pudiese afectar de forma global al hemograma. Entre los criterios de inclusión utilizados cabrían destacar los siguientes:

➤ Exploración física normal. De forma previa a la toma de muestras se realizó:

- Examen externo del animal, anotando cualquier alteración cutánea (costras, zonas de alopecia, heridas, presencia de nódulos, malformaciones evidentes, etc.) o a otro nivel (presencia de secreción nasal, lesiones evidentes a nivel ocular o periocular, presencia severa de parasitación externa por pulgas o garrapatas, presencia de secreción vaginal anómala, etc.) que pudiera hacer sospechar de alguna patología sistémica o afección generalizada, siendo las mismas causa de descarte para la inclusión en el estudio.

- Evaluación del estado de carnes del animal (BCS o *Body Condition Score*) en una escala entre 1 (muy delgado) y 9 (obeso), siguiendo las indicaciones previamente publicadas de forma específica para burros (Pearson y Ouassat, 2000). El BCS se anotó y únicamente se descartaron animales en muy bajo estado de carnes (1 y 2/9) -que podría indicar una patología subyacente o mal estado de nutrición- o animales marcadamente obesos (8 y 9/9) -los cuales suelen tener tendencia a presentar hiperlipemia y otras patologías del metabolismo endocrino-metabólico en esta especie (Mendoza *et al.*, 2015).

- Exploración de la forma y consistencia de los cuatro cascos, descartándose la presencia de anomalías como heridas, malformaciones del casco, crecimientos anómalos en la tapa, etc.

- Evaluación de los depósitos grasos del animal, con especial atención a la morfología del cuello. Se descartaron animales con cuellos con un depósito graso muy evidente y marcado, siguiendo la escala publicada por nuestro grupo de investigación (Mendoza *et al.*, 2015). En esta escala el depósito graso a nivel del cuello se clasifica entre 0 (inexistente) a 4 (cuello con cresta muy marcada). Los animales con *neck score* de 4 se descartaron, debido a la correlación demostrada entre este parámetro y la presencia de hipertrigliceridemias y endocrinopatías (Mendoza *et al.*, 2015).

➤ Constantes vitales dentro de los valores de referencia para asnos. Se realizaron las siguientes mediciones, descartándose cualquier animal que no cumpliera con los rangos de referencia previamente publicados:

- Toma de temperatura corporal (rectal) mediante termómetro digital. Rango de referencia: $37,4 \pm 0,5$ °C (Lemma y Moges, 2009).

- Examen visual de la coloración de las mucosas oral y conjuntival, las cuales debían aparecer con una coloración sonrosada y nunca pálidas, ictéricas o con presencia de halo endotóxico.

- Tiempo de relleno capilar a nivel de la mucosa oral, realizándose una pequeña presión dactilar en la zona de la encía del maxilar y cronometrando el tiempo en el cual el color de la zona presionada retornaba al inicial. Este tiempo debía ser inferior a 2 segundos.

- Toma de la frecuencia cardiaca mediante fonendoscopio (estetoscopio Classic III de 3M Littman). Rango de referencia: 38-48 latidos por minuto (Lemma y Moges, 2009). Se aprovechó la auscultación cardiaca para descartar la presencia de cualquier arritmia patológica.

- Toma de frecuencia respiratoria, mediante examen visual del movimiento del costillar e hijar. Rango de referencia: 14-26 respiraciones por minuto (Lemma y Moges, 2009).

- Auscultación pulmonar. Aprovechando el momento de la auscultación cardiaca, también se auscultaron varias zonas de los campos pulmonares izquierdo y derecho en busca de ruidos respiratorios anómalos.

- Auscultación del peristaltismo intestinal, anotándose la frecuencia e intensidad de los borborigmos en los cuatro cuadrantes (dorsal y ventral por ambos lados).

- Comprobación de la presencia de pulso digital a nivel del surco entre los tendones flexores y el suspensorio.

➤ Ausencia de historial de cualquier enfermedad al menos en el año anterior a la toma de muestras. Para ello se realizó una breve entrevista con los encargados y/o dueños del cuidado de los animales, indagando sobre la presencia de procesos sistémicos conocidos o diagnosticados en la granja en los últimos meses/años.

➤ Ausencia de tratamientos farmacológicos en el mes anterior a la toma de muestras. Se utilizó de nuevo la entrevista con los cuidadores para poder descartar aquellos animales bajo tratamiento.

- Correcto estado de desparasitación (al menos anual a base de ivermectina).

- En cuanto a las hembras, se descartaron aquellos animales en avanzado estado de gestación, debido a la presencia de abundantes y documentados cambios en el hemograma de las burras, sobre todo centrados en la última fase de la gestación (Bonelli *et al.*, 2015).

- También se descartaron, para evitar una variabilidad en los datos fruto de las diferencias específicas por edad, aquellos burros no destetados o cuya edad estimada o confirmada por el cuidador fuese inferior a 1 año (Caldin *et al.*, 2005; Zakari *et al.*, 2015).

- Estado sanitario según determinaciones previas laboratoriales. Como se detallará más adelante, también se descartaron animales de forma previa a las mediciones según hallazgos sobre la misma muestra sanguínea, ya fuese la presencia de lipemia o hemólisis manifiesta macroscópicamente (que podrían ser indicadoras de un cuadro patológico subclínico) o cuadros de hipoproteinemia y/o hiperfibrinogenemia (siendo esta última una de las más comunes proteínas de fase aguda utilizadas en equinos e indicadora de procesos infecciosos o inflamatorios subyacentes -Hulten y Demmers, 2002-).

Cualquier animal cuya exploración física o constantes vitales estuviesen fuera de la normalidad, o bien que presentase un historial de enfermedad, tratamiento o parto reciente, así como aquellos individuos con déficits en el programa de vacunación/desparasitación o ruchos de menos de 1 año fueron eliminados del estudio, si bien en numerosas ocasiones el muestreo se realizó para llevar a cabo un control sanitario completo de cada explotación.

Igualmente, si bien este descarte se realizó a posteriori, tampoco se incluyeron en el estudio aquellos individuos cuyas muestras presentaban una evidente presencia de sustancias interferentes con las técnicas hematológicas (lipemia/hemólisis, más detalladamente descritas en el apartado correspondiente tras toma de muestras).

Por último, tras la toma de todas las muestras, sólo se incluyeron en el estudio aquellos asnos de los cuales se disponía de suficiente muestra como para realizar todas las determinaciones hematológicas con todos los analizadores testados.

2. Toma de muestras.

Las muestras sanguíneas se tomaron en las propias granjas de los animales, por parte de personal especializado en burros y con la ayuda para el manejo de los dueños o cuidadores usuales de los animales. Durante todo el manejo y toma de muestras, los animales se trataron conforme a la legislación vigente de bienestar animal (R.D. 1201/2005). De igual forma, este experimento contó con el visto bueno del Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Córdoba (referencia 2015PI/03), y de la Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera de la Junta de Andalucía (referencia 19-03-15-213)

Los animales fueron manejados intentando minimizar en todo momento el estrés por las maniobras y propiciando un muestreo rápido, con una contención mínima. Se procuró de igual forma mantener el animal dentro de su grupo, respetándose así el comportamiento gregario de los burros y se evitó en todo momento el uso de medios de contención a los que los animales no estuviesen habituados (potros de contención, etc.). En ningún animal se utilizó sedación u otro tipo de farmacoterapia para la contención o sedación.

La toma de muestras se extendió a lo largo de los años citados, realizándose extracciones en distintas épocas del año. Siempre se realizaron en todas las explotaciones a primera hora del día y con los animales en ayuno de corta duración. Todas las explotaciones utilizadas en el presente trabajo tenían un carácter semiextensivo, con una alimentación basada en forraje a base de heno de alfalfa y paja, y suplementación con grano de avena. Usualmente los animales comían dos veces al día. El día anterior a la toma de muestras se realizó un ayuno corto (para evitar la aparición de dislipemias e hiperlipemias secundarias a ayunos más prolongados), de forma que los cuidadores/dueños de la explotación solo aportaron la comida de la tarde, dejando a los

animales libre acceso al agua de bebida y no aportando nuevo alimento hasta la finalización de la toma de muestras.

Para la adquisición de la muestra sanguínea, se realizó una venipunción yugular utilizando agujas con un calibre de 18G (1,2 milímetros de diámetro y 38 mm. de longitud (Terumo, Madrid, España) acopladas a jeringas de 20 mililitros (Terumo, Madrid, España), previa limpieza y desinfección con algodón y alcohol de la zona de extracción. Tras desacoplar la aguja y el tapón de los tubos hematológicos, la muestra se vertió con cuidado en tres tubos de 4 mililitros de EDTA tripotásico (Tubos TAPVAL, Aquisel SL, Barcelona, España) y un tubo de EDTA específico para determinaciones hematológicas en el analizador LaserCyte (Idexx VetCollect, Idexx Europa, Hoofddorp, Países Bajos). Todos los tubos se invirtieron suavemente varias veces para asegurar una mezcla homogénea del anticoagulante con la muestra y se comprobó que el llenado de los mismos era correcto (evitándose desproporciones entre la sangre y la cantidad de anticoagulante).

Las muestras se conservaron de inmediato en una nevera portátil (Waeco Cool-Ice WCI-13, Dometic España, Madrid, España) a 4°C con ayuda de placas condensadoras de frío y fueron transportadas a las dependencias del Departamento de Medicina y Cirugía animal y al Laboratorio del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Córdoba a la mayor brevedad posible. En todas las tomas de muestra el tiempo entre la misma y la medición de los parámetros hematológicos fue inferior a 12 horas, en pos de evitar envejecimiento de la muestra y aparición de artefactos (Clark *et al.*, 2002).

3. Procesamiento de las muestras.

A la llegada a los laboratorios del grupo de investigación, las muestras se atemperaron a temperatura ambiente y se mantuvieron homogeneizadas y en movimiento suave mediante el uso de un balancín (Auxilab S.L., Navarra, España). Antes de las mediciones, se comprobó la ausencia de coágulos macroscópicos en las muestras mediante examen visual. Todas las muestras tuvieron el mismo manejo por parte de los mismos técnicos y se evaluaron de forma anónima (mediante un código de identificación) y en paralelo, sin priorizar ni establecer un orden para los distintos equipos de hematología.

1. Estudio de factores analíticos de interferencia.

Uno de los tubos de EDTA de cada animal se centrifugó para separar el plasma y poder evaluar la presencia de interferencias (lipemia/hemólisis/ictericia) que pudiesen falsear los resultados de los tests hematológicos.

En el caso de la lipemia, se evaluó mediante comparación visual con la escala de lipemia utilizada en el Servicio de laboratorio del Hospital Clínico Veterinario Francisco Santisteban de la Universidad de Córdoba. Dicha escala refleja el índice lipémico mediante diluciones seriadas de Intralipid 20 (Baxter Healthcare Corporation, Estados Unidos), siguiendo las indicaciones de publicaciones de medicina humana (Nanji *et al.*, 1998; Bornhorst *et al.*, 2004). Para realizar una comparativa específica para muestras de asnos, se creó una escala de índice lipémico específica para esta especie. Para ello se prepararon 5 diluciones de Intralipid 20 en plasma procedente de burros sanos: índice lipémico 0 (0 mg/dL de Intralipid 20 añadidos), índice + (125 mg/dL), ++ (250 mg/dL), +++ (500 mg/dL) y ++++ (1000 mg/dL). Se compararon los plasmas separados de las muestras con dicha escala, para descartar cualquier muestra con ++ o mayor lipemia, evitándose así una alteración de los resultados hematológicos (Layton *et al.*, 1989).

Para la hemólisis también se realizó una escala específica para burros, siguiéndose la metodología descrita anteriormente en veterinaria (Di Martino *et al.*, 2015) y que también es rutinaria en el Servicio de laboratorio. Para ello se centrifugó una muestra al azar y, tras comprobar que la misma no presentaba hemólisis, se volvió a reconstituir la sangre en el tubo. Esta muestra de sangre se alicuotó en 3 tubos eppendorfs y 2 de ellos se sometieron a una rotación-agitación agresiva utilizando un agitador de eppendorfs tipo vórtex (RSLAB-6PRO, Auxilab, Beriaín, España) durante 30 segundos y 3 minutos. Tras volver a centrifugar cada una de las alícuotas, se separó el plasma de cada alícuota, creando así un patrón 0 de hemólisis (muestra sin agitación), + (30 segundos) y ++ (3 minutos). De forma aproximada, y de acuerdo a las publicaciones previas, el patrón 0 tendría menos de 30 mg/dL de hemoglobina (Di Martino *et al.*, 2015). En las muestras de este estudio se descartó cualquiera que presentase un grado de hemólisis distinto a 0.

En el caso de la ictericia, y debido al consenso respecto a su escaso efecto en las variables hematológicas, la misma no fue evaluada en las muestras procesadas.

4. Estudio hematológico manual.

4.1. Hematocrito manual.

El hematocrito manual (PCV) se obtuvo mediante la técnica de microcentrifugación, utilizándose una centrífuga específica (Biofuge, Heraeus Instruments, Hanau, Alemania). De forma breve, dos capilares de vidrio (ICT, Sevilla, España) sin anticoagulante se llenaron de sangre a partir de los tubos con EDTA de las muestras, sellando uno de sus extremos con plastilina (muestras por duplicado). Los capilares se sometieron a una centrifugación a 11.000 revoluciones por minuto durante 5 minutos y posteriormente se determinó el volumen ocupado por los eritrocitos respecto al total de la muestra centrifugada gracias a un lector manual de hematocrito mediante escala (Gricel, Auxilab, Beriain, España). Esta determinación se hizo por duplicado y se llevó a cabo por dos observadores independientes, obteniéndose la media de ambas mediciones.

Tras la evaluación del PCV, el plasma separado mediante esta centrifugación se volvió a evaluar, comparándose con las escalas específicas para asno de lipemia y hemólisis previamente explicadas. Este plasma se utilizó igualmente para obtener el valor de proteínas totales plasmáticas (o sólidos totales) mediante refractometría, utilizando un refractómetro manual de proteínas plasmáticas con doble escala (modelo FG-301, Auxilab, Beriain, España), así como la concentración plasmática de fibrinógeno. La concentración plasmática de fibrinógeno de la muestra se cuantificó mediante la técnica de precipitación por calor. Brevemente, se sometió uno de los capilares obtenidos tras la centrifugación a un baño maría (56-58 °C) durante 3 minutos (baño Nahita, Auxilab, Beriain, España) y se volvió a centrifugar a 11.000 rpm durante cinco minutos. Una vez finalizada esta segunda centrifugación, se midieron los sólidos totales mediante refractometría y se obtuvo la concentración de fibrinógeno como la diferencia entre esta medición y la previa al baño maría. Este método se basa en el carácter termolábil del

fibrinógeno, permitiendo valorar su concentración tras su precipitación por calor, siendo reconocida como una técnica fiable y precisa en medicina equina (Tamzali *et al.*, 2001).

4.2. Contajes manuales de leucocitos y eritrocitos.

Los contajes manuales de leucocitos (WBC) y eritrocitos (RBC) se realizaron con los sistemas específicos Unopette de Becton Dickinson (BD Biosciences, Franklin Lakes, Estados Unidos), siguiendo las indicaciones previamente publicadas para medicina veterinaria (Estridge *et al.*, 1999; Gorman *et al.*, 2009), y una cámara de contaje o hemocitómetro de tipo Neubauer (Weber Scientific International Ltd., Middlesex, Reino Unido). La cámara de contaje utilizada poseía dos cuadrículas con subdivisiones, tal y como aparece en la Figura 5. De cada muestra se obtuvieron los contajes de eritrocitos y leucocitos totales por triplicado, realizando el doctorando uno de ellos y cada uno de los directores del trabajo dos más. Cuando el coeficiente de variación obtenido para alguna muestra fue superior al 25%, los contajes se volvieron a repetir para descartar un fallo por error de algún observador.

En el caso de los leucocitos, el sistema Unopette utiliza una solución de ácido acético al 3% para provocar la hemólisis de los eritrocitos y facilitar el contaje de leucocitos y plaquetas. En este trabajo se utilizó el tamaño de Unopette de 0,5 mL, que contiene 0,475 μ L de diluyente en un reservorio y una pipeta con un capilar de 25 μ L de capacidad, realizando de forma semiautomática una dilución al 1:20 al mezclarse la sangre del capilar con el diluyente del reservorio. Únicamente se usó este sistema Unopette para el contaje leucocitario. Previamente a la carga de la muestra se punzó el reservorio del sistema Unopette con la pipeta de carga, rompiéndose así el diafragma de protección. Dicha pipeta se cargó con sangre con EDTA y se permitió que el volumen precargado se mezclara con el líquido presente en el reservorio, invirtiendo suavemente el sistema durante 1 minutos. Una vez realizada la mezcla se dejó el sistema en reposo durante 10 minutos para permitir una hemólisis gradual. La zona con la cuadrícula de contaje del hemocitómetro se cubrió con un cubreobjetos de vidrio de 24x24 milímetros (Menzel-Gläser, Braunschweig, Alemania) y la cámara se cargó con la sangre diluida del interior del sistema Unopette (tras descartar las primeras gotas). Una vez cargada la

cámara, se introdujo en una placa de Petri (Auxilab, Beriain, España) junto con papel de filtro húmedo y se dejó reposar durante 5 minutos para permitir que los leucocitos se asentasen y apareciesen en un mismo plano, facilitándose el conteo de los mismos. Los conteos se realizaron con un microscopio óptico Olympus CX40 (Olympus, Tokyo, Japón) y con la ayuda de un contador manual EMIT 14G-AZ (Emit, Vitoria, España).

Inicialmente se localizó la cuadrícula de conteo con el objetivo de 10 aumentos y se contaron los leucocitos presentes en las 4 cuadrículas más externas con 16 subdivisiones (marcadas en verde en la Figura 5). Cada una de estas subdivisiones cuenta con un área de $0,0625 \text{ mm}^2$ y $0,1 \text{ mm}$ de profundidad, resultando en un volumen de $6,25 \text{ nL}$. Por tanto, cada cuadrícula externa presenta un volumen de 100 nL . Tras realizar el conteo de las cuatro cuadrículas externas, se obtuvo la media de entre los cuatro conteos. El mismo procedimiento se realizó en la otra cuadrícula de la cámara de Neubauer, por lo que el resultado final fue la lectura de un volumen de 800 nL , obteniéndose la media para 100 nL . Dentro de cada una de las subdivisiones presentes en la cuadrícula central, únicamente se contaron los leucocitos en el interior de cada segmento, así como aquellos solapados al borde superior e izquierdo del mismo. El resultado final se multiplicó por 20 (factor de dilución) y 10, obteniéndose los leucocitos por microlitro.

En el caso de los conteos manuales de eritrocitos, se utilizó el sistema Unopette específico de 2 mililitros de capacidad, que presenta un reservorio con $1,99 \text{ mL}$ de diluyente (suero salino fisiológico isotónico) y una pipeta con una capacidad de $0,01 \text{ mL}$. La dilución que prepara este sistema automáticamente es al 1:200. La preparación, carga de la pipeta y carga de la cámara siguió la misma metodología que la descrita para los leucocitos, sin que sea en este caso necesaria una incubación de la muestra. No obstante, para permitir un mejor conteo, sí que se dejó la cámara ya cargada en reposo sobre una superficie horizontal durante 5 minutos, en pos de que todos los eritrocitos estuviesen en un mismo plano. En este caso el conteo se realizó con el objetivo de 40 aumentos, contándose los eritrocitos que aparecían en el interior, borde izquierdo y borde superior de 15 subdivisiones de cada una de las cuadrículas centrales (en color amarillo en la Figura 5) y obteniéndose la media. Cada una de estas subdivisiones tiene un volumen de 4 nL , por lo que el número de eritrocitos total por microlitro se obtuvo al multiplicar la media obtenida por 200 (factor de dilución) y 250.

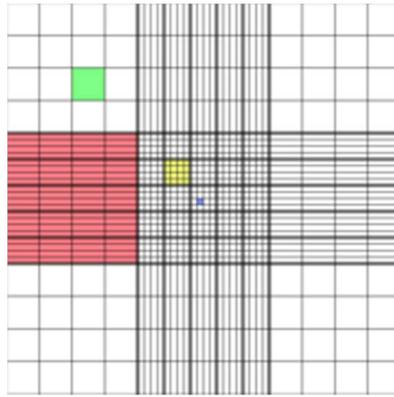


Figura 5. Divisiones existentes en la cámara de Neubauer.

4.3. Realización de los frotis sanguíneos.

Para el conteo diferencial leucocitario y análisis morfológico se utilizaron dos frotis sanguíneos de cada muestra, uno teñido con la técnica Wright-Giemsa y otro con la tinción de nuevo azul de metileno para identificación de reticulocitos, ambos realizados a partir de una alícuota tomada de uno de los tubos de EDTA. Los frotis se realizaron siguiendo la técnica de extensión con un portaobjetos previamente descrita en la sección de revisión bibliográfica. Inicialmente se tomó una alícuota de 20 μL con una pipeta (Eppendorf Reference 2, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) de un tubo previamente en movimiento durante al menos 2 minutos, depositándose la gota en un borde del portaobjetos (Linealab, Badalona, España). Con un segundo portaobjetos, colocado formando un ángulo de unos 45° respecto al primero, se hizo la extensión de la sangre, evitando que la punta de la pluma se extendiese más allá del borde del portaobjetos. El frotis resultante se dejó secar a temperatura ambiente durante 15 minutos

La técnica Wright-Giemsa utilizada se basó en la previamente descrita por varios autores (Woronzoff-Dashkoff, 2002), siendo la misma una modificación específica para trabajar con muestras en un soporte de tinción inclinado (Hecht-Assistent, Berlín, Alemania). En esta técnica se utilizan los siguientes reactivos:

- Solución *stock* de Wright Giemsa. Se prepara mezclando 4 litros de metanol (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos de América) con 13 gramos de tinción de Wright en polvo y 0,4 gramos de tinción de Giemsa en polvo (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos de América). La mezcla se homogeneiza mediante un agitador magnético y se deja durante 12 horas a 37 grados con

agitación continua (agitador magnético calefactado, Labolan, Esparza de Galar, España). Antes de su uso, la mezcla ha de dejarse “envejecer” durante 2 semanas tapada con parafilm.

- Solución de Giemsa para tinción (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos de América).
- Solución de lavado PBS, preparada mezclando 26.52 g fosfato potásico monobásico (KH_2PO_4) y 10.24 g de fosfato disódico anhidro en 4 litros de agua destilada y titrándose a un pH de 6,4 (mediante adición de ácido clorhídrico y medición con un pHmetro electrónico -Labolan, Esparza de Galar, España).
- Solución de trabajo Wright-Giemsa. Se prepara justo antes de la tinción, mezclándose 200 mililitros de solución de lavado PBS, 25 mililitros de solución de Giemsa para tinción y 25 mililitros de la solución *stock* Wright-Giemsa.

La tinción se realizó mediante los siguientes pasos:

1. Se colocó el frotis en el soporte de tinción, con la extensión hacia arriba y la punta de la pluma hacia la zona más externa.
2. Se inundó completamente el frotis con la solución de trabajo Wright-Giemsa y se dejó en reposo durante 5 minutos.
3. Se añadió a la solución, lentamente, un volumen similar (1:1) de solución PBS mediante una pipeta Pasteur de plástico (Labolan, Esparza de Galar, España).
4. Se mezcló la solución de trabajo con el PBS mediante un ligero movimiento del soporte de tinción hasta conseguir una mezcla homogénea y un brillo metálico en la superficie del colorante.
5. Se dejó en reposo la mezcla sobre el frotis durante 15 minutos, con vigilancia continua para evitar que la extensión se secase.
6. Tras los 15 minutos, se aclaró la extensión con agua destilada obtenida mediante un destilador (Smart-Pure 2, Thermofisher, Waltham, Estados Unidos de América) utilizando una piseta o matraz de lavado (Labolan, Esparza de Galar, España) para crear una corriente continua y constante. Este aclarado se mantuvo durante 1 minuto.
7. Se dejó el frotis en reposo y vertical para su secado.

Una vez teñidos los frotis, se deshidrataron durante 1 minuto en xilol (Panreac, Castellar del Vallès, España) y se montaron en un medio de montaje a base de una mezcla de polímeros acrílicos transparentes (Eukitt, Okindler-orstee, Friburgo, Alemania), protegiéndose mediante un cubreobjetos de cristal (Menzel-Glaser, Braunschweig, Alemania).

La tinción de reticulocitos (nuevo azul de metileno) se realizó siguiendo el siguiente protocolo:

- 1.- Se mezclaron dos gotas de solución de azul de metileno (Panreac, Castellar del Vallès, España), con otras dos gotas de sangre con EDTA (dilución 1:1) en un tubo eppendorf (Labolan, Esparza de Galar, España) y se mezcló vigorosa y cuidadosamente.
- 2.- Se dejó incubar la mezcla durante 5 minutos sin movimiento.
- 3.- Se volvió a mezclar el tubo eppendorf cuidadosamente.
- 4.- Se tomó una gota de dicha mezcla y se procedió a realizar una extensión, siguiendo el método previamente descrito.
- 5.- Una vez seco, el frotis se procesó de la misma forma que los teñidos con Wright-Giemsa.

Todo el procesado (preparación de los frotis, tinción de los mismos) fue realizado por el doctorando, permitiendo así la homogeneidad en el grosor y tinción de las muestras.

4.4. Contajes diferenciales leucocitarios.

Los contajes diferenciales leucocitarios se realizaron en los frotis de cada animal siguiendo metodología estandarizada (Koepke, 1980, NCCLS, 1980) y un microscopio Olympus CX40 (Olympus, Tokyo, Japón). En cada frotis se realizaron 3 contajes diferenciales, cada uno por un veterinario (el doctorando y cada uno de los directores de la tesis), siguiendo la misma metodología. De forma breve, se seleccionó una zona de monocapa a dos tercios de distancia entre el origen de la extensión y el borde de la pluma, más cercana a este último. Se siguió un patrón de contaje en zig-zag, comenzando en uno de los bordes de la extensión e interconectándose las áreas de contaje horizontal con secciones cortas de traslación vertical del objetivo. Para incrementar la precisión y sensibilidad del contaje diferencial, se optó por realizar un contaje total de 200 células,

en vez del clásico sobre 100 células. Se contaron 200 leucocitos, apuntándose igualmente el número de eritrocitos nucleados presentes (en su caso) así como las smudge cells, o células con morfología no identificable. En caso de que dichas células no identificables supusiesen más del 10% del conteo total (20 células de un total de 200), se repitió el mismo en otra área diferente. Los leucocitos se clasificaron como: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos o monocitos.

Tras el conteo se transformó cada subpoblación en un dato porcentual y se calculó el coeficiente de variación entre los resultados de los tres análisis realizados por cada veterinario. En los casos donde dicho CV fue superior al 25%, los tres conteos se volvieron a repetir para evitar cualquier desviación a causa del observador.

4.5. Evaluación del frotis sanguíneo.

Sobre los frotis sanguíneos de cada animal también se realizó un estudio hematológico para la caracterización y evaluación de alteraciones morfológicas que pudiesen afectar o interferir con el reconocimiento celular por parte de los analizadores automáticos. Este examen se realizó por parte de 2 veterinarios con amplia experiencia en hematología equina (los directores de la tesis), utilizándose para el reconocimiento de dichas alteraciones las definiciones previamente descritas en la sección de revisión bibliográfica y un microscopio Olympus CX40 (Olympus, Tokyo, Japón). Cada examinador evaluó las siguientes alteraciones en cada frotis:

- Linfocitos grandes granulares (otorgándose un valor de 1 si estaban presentes en la muestra y 0 si no existían).
- Presencia de neutrófilos con signos de toxicidad (basofilia citoplasmática, granulación tóxica, vacuolación citoplasmática, etc.), con valores 0/1.
- Presencia de linfocitos activados o inmunocitos (0/1).
- Presencia de monocitos con el citoplasma vacuolado (0/1).
- Anisocitosis eritrocitaria (0/1).
- Policromasia (0/1).
- Presencia de macroplaquetas (de tamaño superior a 5 microlitros o ligeramente inferior al eritrocito) -0/1-.

- Presencia de agregados plaquetarios (0/1).
- Presencia de cuerpos de Howell-Jolly, clasificándose los animales según los contados en 10 campos de grandes aumentos (400x) en los siguientes grupos: 0, 1, 2, 3, 4 o más cuerpos de Howell-Jolly por 10 campos de grandes aumentos.
- En cada frotis sanguíneo también se realizó una estimación del conteo plaquetario, determinándose el número de plaquetas medias en 10 campos de grandes aumentos (400x). Para dicho conteo se evitaron los agregados plaquetarios y se siguió la misma metodología para la selección del área de conteo que la previamente descrita en el diferencial manual leucocitario. Los animales se clasificaron en los siguientes grupos: 5 plaquetas o menos por campo de grandes aumentos, de 6 a 10 plaquetas, de 11 a 15 plaquetas y más de 16 plaquetas por campo de grandes aumentos.

Por último, para descartar la presencia de reticulocitos en las muestras asnales también se examinaron los frotis teñidos con la técnica del nuevo azul de metileno, realizando los dos veterinarios citados un escaneo de cada frotis para certificar la ausencia de precipitados positivos en los eritrocitos.

5. Estudio hematológico mediante analizador de impedancia.

Se utilizó el equipo de impedancia semiautomático Sysmex F820 (Sysmex Corporation, Kobe, Japón) con un *software* multiespecie preinstalado. Este analizador realiza una diferenciación de los leucocitos en 3 poblaciones. El Sysmex F820 posee un sistema incorporado de aspiración y dilución automática de la muestra, preparado para realizar automáticamente diluciones 1:50 (determinación de leucocitos y hemoglobina) y 1:200 (evaluación de glóbulos rojos y plaquetas). Estas diluciones se realizan en un reactivo específico denominado CellPack (Sysmex Corporation, Kobe, Japón), que contiene cloruro sódico al 0,64%, ácido bórico al 0,1%, tetraborato de sodio al 0,02% y EDTA dipotásico al 0,02%.

El equipo presenta tres sondas de succión (una para la dilución de la muestra, otra para medición de eritrocitos y plaquetas y la última para los leucocitos). La muestra se adquiere directamente a partir del tubo de EDTA y la dilución de la misma se realiza

automáticamente, depositándose las diluciones resultantes en cubetas de plástico específicas.

Una vez obtenida la dilución de eritrocitos y plaquetas, la misma puede leerse directamente colocando la cubeta con la dilución 1:200 en la zona con la sonda de medición correspondiente.

En el caso de los leucocitos, la muestra diluida al 1:50 ha de mezclarse con el reactivo Quickliser II (Sysmex Corporation, Kobe, Japón) y mezclarse mediante agitación manual. Tras 30 segundos el equipo realiza una succión a partir de la cubeta. El reactivo Quickliser II lisa los eritrocitos, permitiendo la determinación por impedancia de los leucocitos, así como la medición de la hemoglobina sérica, estando compuesto por cianuro potásico y agentes detergentes derivados del amonio cuaternario.

Una vez realizadas las determinaciones, el Sysmex F820 muestra los resultados en una pantalla LED, permitiendo también la impresión de los mismos. Los resultados recopilados en este equipo de impedancia fueron los siguientes:

- HCT (%).
- RBC (Recuento de glóbulos rojos), expresado $10^6/\mu\text{L}$.
- WBC (Recuento de leucocitos), en $10^3/\mu\text{L}$.
- Recuento de plaquetas (PLT), en $10^3/\mu\text{L}$.
- Concentración de hemoglobina (Hb), en g/dL.
- Volumen corpuscular medio (MCV), en fL.
- MCH, en pg.
- MCHC, en g/dL.
- RDW, expresado como %.
- Recuentos relativo y absoluto de linfocitos (Lym% y Lym, respectivamente), expresados como % y como $10^3/\mu\text{L}$.
- Recuentos relativo y absoluto de monocitos (Mono% y Mono, respectivamente), expresados como % y como $10^3/\mu\text{L}$.
- Recuentos relativo y absoluto de granulocitos (Gra% y Gra, respectivamente), expresados como % y como $10^3/\mu\text{L}$.

Dado que este equipo no diferencia entre los distintos tipos de granulocitos, se sumaron tanto los porcentajes como los contajes absolutos de monocitos y granulocitos para un mejor análisis comparativo de los resultados con los obtenidos mediante LaserCyte.

6. Estudio hematológico mediante LaserCyte.

El equipo utilizado fue el analizador automático LaserCyte (Idexx Europa, Hoofddorp, Países Bajos). Durante todo el experimento se utilizó el mismo equipo, con la versión de *software* 2.12.122 y las muestras se evaluaron mediante el *software* específico de equinos. La visualización de los resultados se realizó en la plataforma Vet Lab Station (Idexx Europa, Hoofddorp, Países Bajos). Para comprobar la fiabilidad en el funcionamiento del *software* de caballos del LaserCyte, se realizaron de forma aleatoria e intercalada entre las mediciones varios controles internos del *software* equino, consistentes en muestras de sangre de caballos clínicamente sanos. En dichos controles se comprobó que todos los parámetros testados estuviesen dentro del rango sugerido por el equipo y no apareciesen alertas asociadas. Aparte de este control interno, el equipo se mantuvo durante toda la experiencia conectado online a la central de Idexx mediante el programa Idexx SmartService LaserCyte (Idexx Europa, Hoofddorp, Países Bajos).

Para las mediciones en este equipo se utilizaron los tubos específicos con EDTA de LaserCyte (Idexx VetCollect tubes, Idexx Europa, Hoofddorp, Países Bajos), los cuales hubieron de ser insertados en el equipo junto con los tubos para el control interno (y determinación de reticulocitos en otras especies) CBC5R (Idexx Europa, Hoofddorp, Países Bajos).

Una vez finalizado el análisis se recopilaron los siguientes parámetros determinados:

- HCT (calculado por el equipo), expresado como %.
- RBC (Recuento de glóbulos rojos), expresado $10^6/\mu\text{L}$.
- WBC (Recuento de leucocitos), en $10^3/\mu\text{L}$.
- Recuento de plaquetas (PLT), en $10^3/\mu\text{L}$.
- Concentración de hemoglobina (Hb), en g/dL.
- Volumen corpuscular medio (MCV), en fL.

- MCH, en pg.
- MCHC, en g/dL.
- RDW, expresado como %.
- Recuentos relativo y absoluto de linfocitos (Lym% y Lym, respectivamente), expresados como % y como $10^3/\mu\text{L}$.
- Recuentos relativo y absoluto de monocitos (Mono% y Mono).
- Recuentos relativo y absoluto de neutrófilos (Neu% y Neu).
- Recuentos relativo y absoluto de eosinófilos (Eos y Eos%).
- Recuentos relativo y absoluto de basófilos (Baso% y Baso).
- Volumen medio de plaquetas (MPV), en fL.
- Plaquetocrito (PCT), en %.
- Amplitud de la distribución plaquetaria (PDW), en %.

Así mismo, en cada recuento realizado con el equipo LaserCyte, se imprimieron los *scattergramas* de rojos y plaquetas y de leucocitos para su posterior revisión y estudio y se anotaron las posibles alarmas o *flags* presentes en la medición. En este último aspecto, cualquier medición incompleta o llamativamente errónea detectada fue vuelta a medir tras ligera agitación del tubo de la muestra y comprobación de la inexistencia de coágulos en el mismo.

7. Validación del sistema LaserCyte en muestras de burros.

Dado que este fue el primer trabajo en el que se analizó la función del sistema LaserCyte sobre muestras de asnos, fue necesario realizar una validación y estandarización de este equipo de forma previa al mismo. De forma previa a dicha validación, se establecieron las técnicas *gold standard* para los distintos analitos:

- ❖ Técnica del microhematocrito (PVC) para el hematocrito.
- ❖ Diferencial leucocitario de las cinco subpoblaciones típicas obtenido tras un conteo sobre 200 células (siguiendo la metodología anteriormente citada).

Para el resto de analitos, dado que no existen técnicas descritas como standard y no se utilizó en este trabajo ningún analizador superior a LaserCyte, se consideraron los resultados obtenidos por éste como los de mayor fiabilidad.

7.1. Estudio de exactitud de LaserCyte en muestras asnales.

La exactitud fue estudiada para el valor de hematocrito (HCT) y para los contajes diferenciales leucocitarios, parámetros con *gold standard* pre-establecidos. El grado de desviación (o *bias*) de las mediciones de LaserCyte respecto a estos *gold standards* se expresó en unidades absolutas (dependiendo del analito) así como en porcentaje respecto a la media obtenida por LaserCyte.

Para realizar una comparativa más completa del estudio, también se calculó la exactitud de las técnicas manuales y del equipo de impedancia. Respecto al WBC y RBC obtenido manualmente, se consideraron los contajes de LaserCyte como estándares; mientras que todos los parámetros de LaserCyte (salvo para el hematocrito y contajes diferenciales manuales) actuaron como *gold standard* frente a los resultados del equipo de impedancia.

7.2. Precisión intraensayo (replicación intraensayo o intrarun).

Se utilizaron muestras procedentes de 5 burros sanos y que cumplían con todos los criterios de inclusión, seleccionados al azar dentro de la población estudiada. De cada uno de estos animales, durante la toma de muestras, se obtuvieron 2 tubos de 10 mL con EDTA tripotásico como anticoagulante (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Estados Unidos de América) para la realización de este experimento.

Cada muestra se midió 10 veces seguidas (previamente a cada medición se traspasó 1 mL a un tubo con EDTA específico para LaserCyte, estando la muestra en movimiento continuo para respetar la homogeneidad de la misma) y se calculó la media, desviación estándar y el coeficiente de variación (CV) de cada uno de los parámetros aportados por el equipo.

Todas las mediciones se realizaron en el mismo analizador (el mismo también utilizado para el resto del trabajo), en el mismo laboratorio bajo condiciones de trabajo

rutinarias y siempre por parte del mismo operario (el doctorando). Por tanto, y atendiendo a las definiciones aportadas en la sección de revisión bibliográfica, este experimento determinó la repetitividad del LaserCyte para muestras asnales. En este trabajo no se realizaron ensayos de reproducibilidad o replicación *between-baths* debido a no existir muestras homogéneas estandarizadas de asno con capacidad para aportar datos idénticos durante 20 días.

También se calculó el CV del equipo de impedancia y de los parámetros obtenidos manualmente, siguiendo la misma metodología ya descrita para LaserCyte.

7.3. Cálculo del error total calculado y determinación del rendimiento de LaserCyte.

Únicamente se obtuvo el error total calculado (Tec) en aquellos parámetros en los que la exactitud fue determinada (HCT y diferenciales de leucocitos). Este valor se obtuvo sumando la desviación o bias (porcentual) con el CV multiplicado por dos para cada parámetro, siguiendo indicaciones previamente establecidas para hematología veterinaria (Rishniw y Pion, 2016). Este error total se comparó con los TEa aceptados para veterinaria (Cook *et al.*, 2016; Rishniw y Pion, 2016) e igualmente se calcularon los valores de sigma y QGI para cada parámetro conforme a las descripciones de los mismos ya realizadas en la parte de revisión bibliográfica.

7.4. Grado de acuerdo de LaserCyte con otras técnicas en muestras de sangre asnal.

Para comparar el nivel de acuerdo o *agreement* de cada analito con cada una de las técnicas, se creó un gráfico de Bland-Altman comparando los resultados. Este gráfico fue inspeccionado visualmente por ambos directores de la tesis, determinando el nivel de acuerdo aparente basado en el mismo (nivel de *bias* y amplitud de los intervalos al 95% de confianza).

Igualmente, para cada uno de estos estudios cruzados, se creó la curva de regresión de Passing-Bablok, calculándose la ecuación correspondiente y los parámetros intercepción y pendiente (así como sus respectivos intervalos al 95% de confianza), en pos de determinar el grado de acuerdo y la presencia de errores proporcionales o continuos.

7.5. Estudios de interferencia.

Para determinar la interferencia en LaserCyte de muestras lipémicas y hemolisadas de burros se utilizó sangre con EDTA procedente de dos animales sanos, seleccionado al azar y que cumplía los criterios de inclusión (diferentes a los utilizados en otros ensayos de validación del equipo). De estos animales se tomaron, durante el muestreo, dos tubos adicionales de 10 mililitros con EDTA tripotásico como anticoagulante (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Estados Unidos de América).

En el caso de la lipemia, tras homogeneizar la muestra, se alicuotó la sangre (1 mililitro) en varios tubos con EDTA específicos para LaserCyte y los mismos se centrifugaron durante 10 minutos a 3500 rpm y 4°C en una centrifugadora Jouan B4i (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos de América), separándose así el plasma de los elementos formes. Una vez centrifugados, se les añadió un volumen previamente calculado de Intralipid 20 (Baxter Healthcare Corporation, Estados Unidos; que contiene 200 mg de triglicéridos por cada mililitro) para alcanzar distintas gradaciones de lipemia (Nanji *et al.*, 1998; Bornhorst *et al.*, 2004). De forma específica, para cada animal se prepararon las siguientes alícuotas: índice lipémico 0 (no se añadió Intralipid), índice + (con una concentración de triglicéridos de 125 mg/dL, por lo que se añadieron 1,25 mg de lípidos al tubo de 1 mililitro; es decir 6,25 microlitros de Intralipid 20 previa retirada del mismo volumen de plasma originario del animal), índice ++ (concentración final de 250 mg/dL, retirando 12,5 microlitros de plasma originario y sustituyéndolos por Intralipid 20), índice +++ (concentración de 500 mg/dL; sustituyendo 25 microlitros de plasma por Intralipid 20) e índice ++++ (1000 mg/dL de triglicéridos, mediante sustitución de 50 microlitros del plasma inicial por Intralipid 20). Una vez preparados estos tubos se homogeneizaron y mantuvieron en movimiento al menos durante 10 minutos para realizar las mediciones a posteriori en el equipo. Este estudio se realizó por duplicado, obteniéndose el valor medio de ambos análisis y anotándose los resultados de cada alícuota. El grado de interferencia fue determinado en base a las variaciones observadas respecto a la muestra con índice 0 de lipemia.

Para la hemólisis, se siguió la metodología descrita anteriormente en veterinaria (Martínez-Subiela y Cerón, 2005). Para ello, inicialmente, se centrifugó una de las muestras del animal (muestra A) para comprobar ausencia de hemólisis basal en la misma

(mediante comparación con escalas colorimétricas, tal y como se ha explicado anteriormente). A continuación se preparó un hemolisado base a partir de esa muestra A. Para ello se eliminó el plasma de la muestra ya centrifugada y se diluyó el concentrado eritrocitario libre de plasma con un volumen similar de solución salina 0,9%. Este hemolisado base se reconstituyó y se mantuvo en movimiento, volviéndose a centrifugar a los 30 minutos. Se determinó la concentración de hemoglobina del plasma de dicho hemolisado (medición en un espectrofotómetro A15 de Biosystems -Biosystems SA, Barcelona, España- con el reactivo específico de hemoglobina -HbAC1 enzimática-) para comprobar un contenido en hemoglobina de 10 g/dL (en caso necesario la muestra se volvió a procesar para aumentar la hemoglobinemia o se diluyó con plasma del asno de origen para disminuir la misma). A partir de este plasma hemolisado base, y utilizando plasma de cada animal para las diluciones, se prepararon plasmas con patrón + (0,25 g/dL de hemoglobina en plasma) y ++ (1 g/dL de hemoglobina en plasma) de hemólisis (Martínez-Subiela y Cerón, 2005). Una vez completado este proceso se centrifugó la muestra que inicialmente se había dejado en reposo (muestra B) y se llenaron tubos específicos de LaserCyte con los tres niveles de hemólisis a testar:

- Hemólisis 0. Muestra B.
- Hemólisis +. Centrifugado de la muestra B, cambiándose el plasma de la misma por el volumen equivalente de plasma con 0,25 g/dL de hemoglobina.
- Hemólisis ++. Misma metodología que la anterior, pero usando el plasma con 1 g/dL de hemoglobina.

Estas tres muestras se dejaron reposar durante 10 minutos en agitación suave y se midieron por duplicado, obteniéndose los resultados medios de ambos análisis. La interferencia de la hemólisis se determinó en base a las diferencias registradas en las muestras respecto a la muestra con índice 0.

La metodología descrita únicamente determina la interferencia de la hemoglobinemia (hemoglobina libre en plasma) en las determinaciones del analizador. Al realizarse centrifugaciones seriadas para eliminar restos celulares, este estudio determinaría los efectos de esta alteración colorimétrica, pero no representaría correctamente un modelo de hemólisis *in vitro* o artefactual (en el cual tienen la misma importancia que la cantidad de hemoglobina libre la presencia de restos eritrocitarios libres en plasma). Por ello, este estudio se repitió siguiendo otro método descrito

anteriormente en veterinaria (Di Martino *et al.*, 2015). Para ello se centrifugó una muestra al azar y, tras comprobar que la misma no presentaba hemólisis, se volvió a reconstituir la sangre en el tubo. Esta muestra de sangre se alicuotó en 3 tubos eppendorfs y 2 de ellos se sometieron a una rotación-agitación agresiva utilizando un agitador de eppendorfs tipo vórtex (RSLAB-6PRO, Auxilab, Beriaín, España) durante 30 segundos y 3 minutos. Tras volver a centrifugar cada una de las alícuotas se comparó el color del plasma resultante con una escala previamente utilizada en veterinaria (Servicio de laboratorio del HCV de la Universidad de Córdoba), comprobando así que las muestras se correspondían a patrón 0 de hemólisis (muestra sin agitación), + (30 segundos) y ++ (3 minutos). De forma aproximada, y de acuerdo a mediciones previas realizadas por el Servicio de laboratorio, el patrón 0 tendría menos de 0,1 g/dL de hemoglobina, el patrón + entre 0,2 y 0,5 y el patrón ++ entre 0,5 y 1 g/dL.

7.6. Estudios de linealidad o del rango analítico.

Siguiendo indicaciones previamente publicadas (Wenger-Riggenbach *et al.*, 2006), se prepararon muestras con valores extremos bajos y altos. De forma específica, en este trabajo se analizó la linealidad de los siguientes parámetros: HCT, RBC, Hb, WBC, subpoblaciones leucocitarias y PLT. Para ello, se utilizó sangre con EDTA tripotásico procedente de un animal sano, seleccionado al azar y que cumplía los criterios de inclusión. De dicho animal se tomaron, durante el muestreo, dos tubos adicionales de 10 mililitros con EDTA tripotásico como anticoagulante (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Estados Unidos de América). Uno de dichos tubos fue centrifugado para separar el plasma y los elementos formes, tal y como se ha descrito previamente. El plasma se separó cuidadosamente, cerciorándose de tomar la muestra de las zonas más superiores del tubo para evitar incorporar cualquier elemento forme. El otro tubo se centrifugó siguiendo un método para aislar la denominada *buffy coat*, o zona rica en leucocitos.

Para ello primeramente se preparó buffer PBS, mezclando en un litro de agua estéril 8 g de NaCl, 0,2 gramos de KCl, 1,44 g de Na₂HPO₄ y 0,24 g de KH₂PO₄ (todos productos de Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos de América). El pH de la mezcla se ajustó a 7,4 mediante HCl (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos de América), utilizando para ello una bureta y un pHmetro electrónico (Labolan, Esparza de Galar, España). Una vez preparada la mezcla la misma se autoclavó en un autoclave Matachana Serie 101i

(Antonio Matachana SA, Barcelona, España) y se dejó reposar durante un día a temperatura ambiente.

En un tubo sin anticoagulante de plástico cónico de 20 mL (Labolan, Esparza de Galar, España) se mezclaron 9 mL de sangre con anticoagulante y 9 mL de PBS (proporción 1:1), añadiéndose 360 mL (2%) de suero fetal bovino (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos de América). Tras homogeneizar mediante balanceo manual, esta mezcla se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos en una centrifuga Jouan B4i (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos de América). Después de esta centrifugación se recogió cuidadosamente, mediante pipeta de Pasteur la zona del *buffy coat*, incluyéndose el plasma sobre el anillo y más cercano al mismo (que es la porción más rica en plaquetas). Este concentrado plaquetario y leucocitario se alicuotó en un tubo con EDTA. A continuación, se alicuotó el concentrado eritrocitario, tomándose para ello la muestra de las zonas más bajas del tubo. Una vez se separaron los componentes se prepararon los siguientes tubos de LaserCyte:

- Muestra basal de leucocitos y plaquetas: mezclando 0,5 mL de plasma con 0,5 mL del concentrado leucoplaquetario obtenido a partir de 10 mL.
- Dilución 1: 0,75 mL de plasma con 0,25 del concentrado (1/2 de la muestra basal).
- Dilución 2: 0,875 mL de plasma y 0,125 mL del concentrado (1/4 basal).
- Dilución 3: 0,9375 mL de plasma y 62,5 µL del concentrado (1/8 basal).
- Dilución 4: 968,7 µL de plasma y 31,2 µL de concentrado (1/16 basal).
- Dilución 5: 984,3 µL de plasma y 15,6 µL de concentrado (1/32 de la muestra basal).

En el caso de los eritrocitos se siguieron las mismas diluciones utilizando el concentrado eritrocitario obtenido tras centrifugación de 10 mL de sangre.

Las diluciones leucoplaquetarias se usaron para calcular la linealidad de las concentraciones de plaquetas, leucocitos totales, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos, así como del plaquetocrito. Las diluciones a partir del concentrado eritrocitario se usaron para el cálculo de la linealidad del hematocrito (HCT), concentración de glóbulos rojos, concentración de hemoglobina y MCHC. Para el resto

de variables hematológicas, debido a su esperable invariabilidad según la dilución (RDW, por ejemplo), no se analizó la linealidad.

Todas las diluciones (5 diluciones leucoplaquetarias y 5 eritrocitarias) se analizaron por duplicado, obteniéndose la medición media de ambos análisis. Para cada analito se determinó el resultado en las distintas diluciones, el resultado esperado (factor dilucional aplicado a los resultados de la muestra basal) y la desviación entre ambos. Igualmente, para cada analito, se obtuvo la curva de regresión lineal, ecuación de dicha curva, pendiente y punto de intercepción.

7.7. Análisis del background o límite de blanco de LaserCyte para muestras asnales.

Dado que IDEXX no proporciona información sobre los límites inferiores de detección de LaserCyte para ningún parámetro, se realizó un estudio para determinar el nivel de *background* de los siguientes parámetros: RBC, HCT, Hb, WBC, subpoblaciones leucocitarias y PTL. El *background* del resto de parámetros no fue calculado debido a la imposibilidad de obtener muestras estandarizadas en asnos con valores conocidos y alterables para los mismos.

Para realizar esta determinación se utilizaron los datos obtenidos de las diluciones preparadas para el estudio de linealidad. El límite de blanco se estableció como el valor mínimo que el analizador fue capaz de devolver para cada parámetro, correspondiéndose normalmente a la mayor dilución a la cual el equipo fue capaz de devolver un valor para dicho analito. En los casos en que el analizador fue capaz de devolver datos en la dilución 1/32 del concentrado, se prepararon diluciones sucesivas al 1/64 y 1/128 con plasma del propio asno.

7.8. Estudio del efecto carryover en LaserCyte con muestras asnales.

Este análisis se realizó para RBC, WBC y PTL. Se utilizó la ecuación reportada por Vis y Huisman, en 2016. Para ello se midió por triplicado una muestra con valores elevados (muestra basal utilizada para el experimento de linealidad, preparada a partir del concentrado eritrocitario para RBC y a partir del leucoplaquetario para WBC y PTL) y a continuación se midió por triplicado una muestra con valores bajos (dilución 5 de cada uno de los concentrados respectivos). Este cálculo se realizó por duplicado en dos animales seleccionados al azar que cumplieran los criterios de selección (distintos a los

utilizados en otros análisis de validación). La metodología para la realización de los concentrados y diluciones siguió las instrucciones previamente detalladas.

7.9. Estudios de las alertas de LaserCyte es muestras de asno.

Durante todo el experimento se recopilaron las alertas (o *flags*) exhibidas por el analizador así como los parámetros que el equipo consideró fuera de rango (elevados/disminuidos) en base a los rangos previamente establecidos para caballos con este equipo. El analizador utilizado en esta experiencia presentaba un *software* con capacidad de señalar todas las alertas comentadas previamente en la sección de revisión bibliográfica (VRL, RD y WD -distinguiéndose DB 1/2, 1/3, 1-5, 2/8, 3/4, 5, 7 y 10-). No se consideró la alerta PA (presencia de agregados plaquetarios), debido a que la misma no se analiza ni genera en este equipo en muestras distintas a las procedentes de gato o hurón. Tampoco se tuvieron en consideración las alertas correspondientes a mal funcionamiento/calibrage del análisis (HC, IQA y TI).

En pos de determinar la fiabilidad de dichas alertas, se revisaron los resultados de los animales marcados, comprobándose que realmente existía el problema indicado por LaserCyte, clasificándose así dichas alertas como falsos/verdaderos positivos. De forma más concreta, esta comprobación de las alertas se realizó de la siguiente forma:

- VRL (Value Out of Range o valor fuera de rango). Se comprobó el valor resultante respecto a los rangos de referencia obtenidos con todas las muestras del estudio.
- RD (RBC Abnormal Distribution o distribución anómala eritrocitaria, código que también se aplica para el recuento anormal plaquetario). Se comprobó, consultando el contaje manual eritrocitario, si la concentración de glóbulos rojos se encontraba anormalmente baja (Esta alerta suele identificar muestras con un RBC entre 0,25 y 1 millón por microlitro).
- WD (WBC Abnormal Distribution o distribución anómala de los leucocitos, así como el resto de alertas indicadoras de diferencial anómalo). Se comprobó, con el contaje diferencial manual, si realmente existía una distribución porcentual anómala de los leucocitos. De forma genérica, para todos los subcódigos que forman parte de esta alarma, se determinó si el porcentaje calculado de

leucocitos se correspondía con el del conteo manual y además se determinó si dichos porcentajes estaban fuera de rango de los establecidos para burros en este equipo (obtenidos con el total de muestras).

7.10. Efecto de las alteraciones morfológicas del frotis en los resultados de LaserCyte.

Una vez recopiladas las alteraciones presentes a nivel del frotis sanguíneo (previamente detalladas), se analizó el efecto que la presencia de las mismas pudiera haber tenido sobre los resultados de LaserCyte, comparándose los datos de los animales que presentaban dichas alteraciones en el frotis con los provenientes de animales sin las mismas.

8. Estudio morfométrico de leucocitos asnales.

Con el objetivo de determinar si el tamaño celular podría ser una causa de interferencia/fallos en la clasificación leucocitaria por parte del analizador LaserCyte en burros, así como comprobar las variaciones presentes en dichos tamaños entre especies, se realizó un estudio morfométrico del tamaño leucocitario en muestras de los animales analizados.

Para ello se partió de muestras de sangre en EDTA de 4 animales (elegidos al azar, todos cumpliendo con los criterios de inclusión en el estudio). De estos 4 animales se tomaron, además de las muestras ya mentadas, 2 tubos de 10 mL con EDTA como anticoagulante (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Estados Unidos de América). Ambos tubos se centrifugaron para obtener el *buffy coat*, tal y como se ha detallado anteriormente. Se tomaron varias muestras, mediante pipeteo cuidadoso con una micropipeta (Eppendorf Reference 2, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) del centro del anillo del *buffy coat*, evitando la contaminación tanto con eritrocitos como con plasma (para evitar también la contaminación por plaquetas). La muestra obtenida se extendió en varios portaobjetos y se preparó conforme a la metodología descrita para los frotis sanguíneos. De cada uno de los 4 animales se prepararon al menos 10 frotis de *buffy coat*, procesándose las muestras y realizándose las extensiones siempre por el mismo operario (el doctorando), para así homogeneizar el protocolo de preparación, extensión y grosor del frotis final. Estos frotis

se tiñeron con el método Wright-Giemsa modificado previamente detallado y se montaron utilizando Eukitt.

Una vez preparados los frotis de *buffy coat*, los mismos fueron examinados por los directores del trabajo con un microscopio Motic BA310 equipado con una cámara Moticom 580Int (Motic, Hong Kong, China), buscándose áreas adecuadas para realizar microfotografías en pos de medir el tamaño celular leucocitario. Para ello se escaneó el frotis en busca de zonas donde las células se encontrasen en monocapa y aisladas unas de otras, así como con su citoplasma adecuadamente extendido (sin mostrar áreas de superposición, constricción o solapamiento), sin mostrar artefacto alguno (descartándose leucocitos no reconocibles o aquellas células con signos de cariorrexis, cariólisis, picnosis o rotura citoplasmática). Así mismo, se buscaron zonas con una tinción adecuada, que permitiese la correcta diferenciación de los límites del citoplasma y el reconocimiento celular. Cuando dichas áreas fueron reconocidas, se tomaron microfotografías con una cámara adaptada al microscopio con el objetivo de 40x (400 aumentos). Como mínimo se obtuvieron 20 imágenes de cada uno de los 10 frotis de *buffy coat* de cada animal (conformando un total de 800 imágenes).

Una vez obtenidas las imágenes, el estudio morfométrico se realizó con el programa ImagePro Plus (ImagePro Plus 7, Media Cybernetics, Rockville, Estados Unidos de América). En este programa, en cada imagen, se identificaron los elementos formes (eritrocito, neutrófilo, linfocito, monocito, eosinófilo o basófilo) y se determinó el diámetro (en píxeles) de cada célula con la herramienta “longitud”. En pos de facilitar una medición útil y comparable a otras publicaciones, el tamaño medido (en píxeles) se transformó en micras. Para ello, utilizando el mismo fotomicroscopio, cámara y objetivo, se realizaron microfotografías de una serie de figuras de tamaño precalibrado cinceladas en un portaobjetos (portaobjetos calibrado, Motic calibration slide, Motic, Hong Kong, China). Estas mediciones de calibración se realizaron por cuadruplicado en cada una de dichas figuras, obteniéndose finalmente el factor de conversión (píxeles a micras) adecuado para los resultados morfométricos.

Una vez medidas todas las células, se recopilaron los diámetros medios, la distribución por diámetros de eritrocitos y cada subpoblación leucocitaria, así como la relación respecto al tamaño de los glóbulos rojos de cada tipo celular.

9. Análisis estadístico.

Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar de la media (DE). Para cada parámetro, la normalidad se determinó con el test de Shapiro-Wilk. Se estudió el efecto del sexo (machos/hembras) y la edad sobre cada una de las variables obtenidas. Respecto a la edad, para facilitar el trabajo estadístico y obtener datos más informativos, la población muestreada se dividió en los siguientes grupos: animales de 1 a 5 años, de 6 a 10 años, de 11 a 15 años, de 16 a 20 años, de 21 a 25 años y burros mayores a 25 años. También se realizaron análisis estadísticos para determinar el efecto de la explotación de origen del animal y la estación del año en la que se realizó la toma de muestras sobre todos los parámetros. No obstante, no se observaron variaciones por estos dos últimos factores comentados.

Para el cálculo de diferencias entre dos grupos se utilizó el test de Mann-Whitney (variables sin distribución normal) o el t-test (variables paramétricas) en el caso de comparaciones entre dos grupos. Para comparaciones entre más de dos grupos se utilizaron los tests Kruskal-Wallis (datos no paramétricos) seguido por un test de corrección de Bonferroni o bien (en datos con distribución normal) un test ANOVA seguido de un test LSD de Fisher.

Los intervalos de referencia hematológicos se calcularon utilizando los percentiles 2,5 y 97,5 obtenidos mediante el test de Tukey-Hinges.

La exactitud se determinó como los diferenciales absolutos y porcentuales de las técnicas *gold standard* (o similares) respecto a la media del equipo testado, La precisión (intraensayo) se calculó mediante el CV (DE/media x 100). El error total se calculó siguiendo la fórmula ya citada en el apartado de revisión bibliográfica (desviación + 2 x CV).

El grado de acuerdo entre técnicas se determinó en base al gráfico de Bland-Altman, calculándose en el mismo la desviación media del equipo o técnica a testar así como los intervalos al 95% de confianza de dicha desviación. El nivel de acuerdo también se evaluó mediante regresión de Passing-Bablok, creándose el correspondiente gráfico y calculando la línea de regresión, ecuación de regresión y valores de pendiente e intercepción para cada gráfico, así como los intervalos de confianza al 95% para cada línea de regresión,

pendiente e intercepción. De forma genérica, se consideró el acuerdo entre técnicas bueno cuando el intervalo de confianza al 95% de la intercepción incluía el valor 0 (ausencia de errores constantes) y el valor 1 para dichos intervalos de la pendiente (ausencia de errores proporcionales). Si alguno de estos criterios no se cumplía, el nivel de acuerdo se consideró como pobre. Igualmente se calculó el grado de correlación mediante el test de Spearman (datos no paramétricos) o de Pearson (datos con distribución normal).

La linealidad de LaserCyte se evaluó mediante comparación con los datos esperables de las sucesivas diluciones de los concentrados eritrocitarios y leucoplaquetarios. Para cada parámetro se determinó el nivel de correlación (test de Spearman), el punto de intercepción, la pendiente y el rango analizado. Para cada analito, la mayor dilución a la cual LaserCyte pudo devolver un valor fue identificada como el límite de blanco o valor de *background*.

El efecto *carry-over* de LaserCyte se calculó siguiendo la ecuación de Vis y Huisman (2016), recogida en la revisión bibliográfica.

En todos los casos se consideró como nivel de significancia estadística un valor de P inferior a 0,05.

En el caso de las anomalías morfológicas presentes en la sangre, para determinar si las mismas podrían interferir en los resultados de los analizadores, se compararon animales con presencia de dichas anomalías y animales sin las mismas (tipo de test similar a los ya descritos y dependiente del número de clasificaciones según alteración, así como del tipo de distribución de los datos). Por último, también se determinó la influencia de estas variables mediante un estudio de correlación (test de Pearson o de Spearman según distribución hallada en los datos).

Los datos se recopilaron y compilaron utilizando el programa Excel 2016 de la suite de Microsoft Office (Microsoft, Redmond, Estados Unidos de América). El estudio estadístico se realizó con el programa de IBM SPSS Statistics versión 24 (IBM, Armonk, Estados Unidos de América).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Selección de los animales.

En este estudio se incluyeron un total de 256 burros, todos ellos cumpliendo con los criterios de inclusión previamente detallados. Inicialmente el número de muestras a estudio era de 275, si bien se descartaron 10 animales por presencia de lipemia en sus plasmas (7 con un grado ++ y 3 con grado +++), así como 9 asnos por hemólisis evidente (6 con imagen similar al patrón + y 3 con imagen similar a patrón ++ de hemólisis, de acuerdo a la metodología descrita en la parte de material y métodos). De estos animales, 84 (población final a estudio, n=84) se utilizaron para la comparativa entre las tres metodologías hematológicas a analizar.

De forma más detallada, de los 256 burros iniciales, 125 muestras se obtuvieron durante el año 2009; 38 durante el 2010; 30 durante el 2011 y 63 durante el 2012. Las muestras se tomaron en todos los casos en el periodo de primavera-verano, con la siguiente distribución anual: 62 muestras tomadas durante el mes de marzo; 34 durante abril; 43 en mayo; 13 en junio y 104 en julio.

En cuanto a la localización de los animales, se tomaron muestras en un total de 39 ganaderías, las cuales contaban con una media de 6,4 animales por explotación. No obstante, de estas 39 ganaderías, 16 únicamente poseían un asno. En 13 de ellas, el número de burros se encontraba entre 2 y 5, contando con 5 a 10 burros un total de 6 explotaciones y siendo más de 10 los animales presentes en otras cinco explotaciones. La ganadería con mayor representación contaba con un total de 63 burros. Las 39 ganaderías se hallaban en Andalucía, con la siguiente distribución geográfica: 3 explotaciones en Cádiz, 1 en Huelva, 3 en Sevilla, 6 en Córdoba, 2 en Granada y 24 en Málaga. En total, de los animales muestreados, 19 procedían de Cádiz, 3 de la provincia de Huelva, 21 de Sevilla, 47 de Córdoba, 23 de Granada y 143 de Málaga.

En cuanto a la raza, la mayoría (152) de los asnos muestreados eran de raza Andaluza pura, 50 de los mismos eran cruces de la misma y 54 animales fueron declarados por los ganaderos como pertenecientes a la Agrupación Racial Moruna.

Respecto a la edad de los animales muestreados, se incluyeron en este *pool* inicial 108 burros entre 1 y 5 años; 85 animales de entre 6 y 10 años de edad; 37 asnos con entre 11 y 15 años de edad; 19 animales cuyas edades oscilaban entre los 16 y 20 años; 5 burros

con entre 21 y 25 años y 2 asnos con más de 25 años (uno con 28 años y otro de 29 años de edad). La media de edad en este muestreo fue de 8,02 años y el rango de edades muestreado varió entre el año y los 29 años de edad.

En cuanto al sexo, de los 256 animales, 186 eran hembras y 70 machos. Entre estos animales, 186 eran hembras enteras vacías (o sin gestación avanzada evidente), 20 eran machos castrados y 50 machos enteros. Al aunar los rangos de edades y el estado sexual se obtuvo la siguiente estructura poblacional:

- Animales de 1 a 5 años (n=108): 77 hembras, 24 machos enteros y 7 machos castrados.
- Animales de 6 a 10 años (n=85): 61 hembras, 18 machos enteros y 6 castrados.
- Animales de 11 a 15 años (n=37): 29 hembras, 3 machos enteros y 5 castrados.
- Animales de 16 a 20 años (n=19): 15 hembras, 2 machos enteros y 2 castrados.
- Animales de 21 a 25 años (n=5): 4 hembras y 1 macho entero.
- Animales mayores de 25 años (n=2), siendo los mismos machos enteros.

Tal y como se ha comentado, de este total, 84 animales se incluyeron en la comparativa entre técnicas. El resto (172) carecían al menos de uno de los análisis requeridos. De forma concreta, se analizaron 150 muestras mediante técnicas manuales, 185 mediante el sistema de impedancia (incluyéndose en la comparativa 84 de estos animales) y 84 mediante el sistema de láser (todas incluidas en la comparativa).

Una vez detallada toda la población muestreada, pasamos de describir la población final (n=84) sobre la que se realizó el estudio comparativo entre técnicas. Las muestras de estos 84 animales se obtuvieron durante los años 2009 (19), 2010 (2) y 2012 (63), más específicamente en los meses de marzo (62), abril (6), mayo (5) y junio (11). Los animales seleccionados procedían de un total de 20 ganaderías, con una media de 4,2 burros por explotación. De forma más concreta, de las 20 ganaderías, 5 únicamente aportaron 1 asno, 10 aportaron de 2 a 5 asnos, otras 4 explotaciones aportaron de 5 a 10 animales y sólo una ganadería aportó más de 10 animales (introduciéndose en el análisis 19 burros de esta

explotación). Las 20 granjas seleccionadas estaban en Andalucía y, más concretamente, 2 se encontraban en Cádiz (aportando 4 asnos al estudio), otras 2 en Granada (6 burros), 6 en Sevilla (aportando 25 animales) y otras 10 en Málaga (aportando esta provincia los 49 burros restantes).

En cuanto a la raza, la mayoría (67) de los asnos muestreados eran de raza Andaluza pura, siendo 17 de los mismos cruces de esta raza.

Respecto a la edad de los animales incluidos, 31 animales presentaban una edad entre 1 y 5 años; 37 burros tenían entre 6 y 10 años de edad; 9 asnos entre 11 y 15 años de edad y 7 animales oscilaban entre los 16 y 20 años. La media de edad de los animales del estudio fue de 7,11 años (desviación estándar de 5,4 años) y el rango de edades varió entre 1 y 20 años de edad.

En cuanto al sexo, de los 84 animales, 68 eran hembras (todas enteras y no gestantes) y 16 eran machos (10 machos enteros y 6 castrados). Al aunar los rangos de edades y el estado sexual se obtuvo la siguiente estructura poblacional:

- Animales de 1 a 5 años (n=31): 23 hembras, 7 machos enteros y 1 macho castrado.
- Animales de 6 a 10 años (n=37): 34 hembras, 1 macho entero y 2 castrados.
- Animales de 11 a 15 años (n=9): 8 hembras y 1 macho castrado.
- Animales de 16 a 20 años (n=7): 3 hembras, 2 machos enteros y 2 castrados.

La media de edad de las hembras seleccionadas fue de 6,83 años, siendo de 6 años la media de los machos enteros seleccionados y 10,83 la media de edad de los machos castrados seleccionados.

2. Estudio hematológico manual.

2.1. Hematocrito manual.

El hematocrito manual (PCV) medio en este estudio fue de $33,8 \pm 4,7$, con un rango de valores entre 26 y 41. Los percentiles 2,5 y 97,5% fueron respectivamente 28 y 40%. Comparando este intervalo con los publicados para burros utilizando el sistema de

microhematocrito (Mori *et al.*, 2004; Yakubu y Chafe, 2008; Nayeri, 1978) se observa que los datos obtenidos están dentro de los rangos de referencia disponibles. Si esta comparativa la ampliamos al resto de publicaciones en burros (independientemente de la tecnología utilizada para determinar el hematocrito), podemos observar que los burros analizados vuelven a cumplir con los rangos publicados con la excepción de un trabajo realizado con el equipo Advia 120 (Caldin *et al.*, 2005) y otro trabajo (Turnbull *et al.*, 2002), que usó el CellDyn 3500. En ambos trabajos los datos reportados de PCV son anormales (bajos en el primero y altos en el segundo) y de hecho no pueden extrapolarse tampoco a otras publicaciones en burros, por lo que probablemente esas variaciones podrían ser secundarias a idiosincrasias en dichas poblaciones (ejercicio continuado, esplenomegalia por miedo o estrés -como en el caso de Turnbull, donde las muestras se corresponden a asnos salvajes de Emiratos Árabes Unidos-, etc.) o a problemas en la determinación del hematocrito calculado (como es el caso del estudio de Caldin, que no es extrapolable a otros trabajos que incluso usan el mismo analizador).

Al segregar los burros estudiados en los distintos grupos de edad no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos, si bien los burros de entre 6 y 10 años mostraron hematocritos manuales más elevados y los asnos mayores a 16 años fueron los que menores hematocritos mostraron. Las medias y desviaciones estándar de cada grupo de edad fueron las siguientes:

- 5 años o menos: $32,6 \pm 3,3\%$.
- De 6 a 10 años: $35,4 \pm 5,6\%$.
- De 11 a 15 años: $34,1 \pm 3,7\%$.
- De 16 a 20 años: $30,2 \pm 1,9\%$.

Respecto al sexo, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en el valor de PCV entre machos ($33,3 \pm 3,6\%$) y hembras ($34 \pm 4,9\%$). Por último, tampoco se detectaron diferencias estadísticamente significativas relacionadas con el estado reproductor de los animales, la provincia de origen o el año de la toma de muestra.

La ausencia de diferencias en el PCV atendiendo al sexo de los animales estudiados coincide con la mayoría de las referencias publicadas para asnos (Zinkl *et al.*, 1990; French y Patrick, 1995; Folch *et al.*, 1997; Bonelli *et al.*, 2015; Laus *et al.*, 2015). Al igual que sucedió en dichos trabajos, en el caso de este estudio no se observó un PCV

menor en hembras, como sí reportó Nayeri en 1978. Respecto al efecto de la edad sobre el hematocrito, la ausencia de diferencias significativas también coincide con los datos publicados por los citados autores.

2.2. Contajes manuales de leucocitos y eritrocitos.

El contaje manual de eritrocitos (RBC) medio en los 84 asnos fue de $7,5 \pm 2,1$ millones por μL , con un rango de 5,0 a 11,8 millones por microlitro. Los percentiles 2,5 y 97,5% fueron respectivamente 5,7 y 10,4 millones por microlitro.

Al comparar los datos obtenidos con los publicados por Nayeri en 1978 (contaje manual de RBC), se observó la práctica coincidencia en los rangos de ambas poblaciones. En el caso del trabajo de Yakubu y Chafe en el año 2008, también se detectó solapamiento entre los rangos de referencia. No obstante, el valor obtenido por Yakubu en burros de Nigeria fue marcadamente inferior al dato observado en Andalucía. Esta diferencia podría deberse a un cuadro de anemia subclínica en los animales del estudio africano, sospecha que podría confirmarse al observar que el rango inferior en el estudio de Yakubu se corresponde a 2,5 millones de eritrocitos por microlitro. Si ampliamos la comparativa al resto de trabajos actualmente publicados para RBC en burros sí que se produce un amplio solapamiento entre nuestros resultados y los reportados por otros autores (Folch *et al.*, 1997; Caldin *et al.*, 2005; Pitel *et al.*, 2006; Burden *et al.*, 2016).

Al segregar esta población en los distintos grupos de edad no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos, si bien de nuevo los asnos mayores a 16 años fueron los que mostraron un valor más bajo. Las medias y desviaciones estándar de cada grupo de edad fueron las siguientes:

- 5 años o menos: $7,5 \pm 1,7$ millones de eritrocitos por μL .
- De 6 a 10 años: $7,8 \pm 2,1$ millones de glóbulos rojos por μL .
- De 11 a 15 años: $7,8 \pm 3,3$ millones de eritrocitos por μL .
- De 16 a 20 años: $6,5 \pm 2,3$ millones de glóbulos rojos por μL .

En publicaciones anteriores (Zinkl *et al.*, 1990) ya se puso de manifiesto una tendencia a menor RBC en burros de edad avanzada, lo cual coincidiría con los hallazgos en nuestra población. Este hallazgo podría deberse a un cuadro de anemia subclínica, si

bien esta hipótesis aún no ha sido probada. En medicina humana se ha propuesto que esta anemia relativa en individuos de avanzada edad está relacionada con una malabsorción de oligoelementos a nivel entérico así como con cuadros de inflamación-infección crónica subclínica, fallo relativo medular y pérdida de masa renal funcional (Bach *et al.*, 2014).

Tampoco se detectaron diferencias en los RBC manuales según el sexo, mostrando los machos unos contajes de 7,02 (\pm 2) millones y las hembras de 7,7 (\pm 2,1) millones de eritrocitos por microlitro. La ausencia de diferencias estadísticamente significativas según el género coincide con lo reportado por Nayeri y Yakubu para los contajes manuales de eritrocitos en burros. En el caso del trabajo de Nayeri sí que se observó una tendencia (no significativa) de las hembras a presentar un mayor RBC, hallazgo que coincide con los datos obtenidos en nuestra investigación.

En cuanto a los contajes manuales de leucocitos (WBC), la media en la población estudiada fue de 8.900 \pm 3.100 por μ L. Los percentiles 2,5 y 97,5% fueron respectivamente 5.570 y 16.400. Comparando estos resultados con estudios previos del WBC manual en burros, quedan dentro de los rangos reportados por Yakubu y Chafe (2008) pero son significativamente inferiores a los publicados por Nayeri en 1978. Esta diferencia podría deberse a una leucocitosis moderada en el estudio de Nayeri (probablemente debida a la marcada eosinofilia en ese trabajo), ya que los resultados en estos burros iraníes son llamativamente elevados respecto a otras publicaciones. En el resto de estudios (independientemente de la metodología usada) publicados para el WBC en burros, hallamos solapamiento con nuestros rangos de referencia (Folch *et al.*, 1997; Mori *et al.*, 2004; Caldin *et al.*, 2005; Pitel *et al.*, 2006; Burden *et al.*, 2016). Esta amplia coincidencia entre nuestros resultados de WBC manual y los obtenidos mediante tecnologías más avanzadas remarcan la utilidad (aun cuando sólo sea de forma orientativa) de esta técnica en burros.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$) entre los animales de mayor edad (16 a 20 años) y el resto de grupos, siendo las medias y desviaciones estándar de WBC en cada grupo las siguientes:

- 5 años o menos: 9.050 \pm 2.800 por μ L.
- De 6 a 10 años: 9.100 \pm 2.900 por μ L.

- De 11 a 15 años: 9.300 ± 2.100 por μL .
- De 16 a 20 años: 4.500 ± 1.200 por μL .

No obstante, al igual que sucediera con RBC, no se observaron diferencias significativas según el sexo para WBC (hembras con $8,9 \pm 2,9$ millones y machos con $9,2 \pm 3,1$ millones).

La presencia de variaciones significativas en la concentración leucocitaria atendiendo a la edad ya fue esbozada por otros autores al estudiar el hemograma de los asnos (Zinkl *et al.*, 1990; Folch *et al.*, 1997; Stanisic *et al.*, 2015). En el caso concreto de la publicación de Folch y colaboradores, se observaron diferencias entre burros jóvenes y adultos (entendiéndose los primeros como aquellos animales de menos de 3 años de edad). Stanisic también describió diferencias estadísticamente significativas en WBC utilizando los mismos grupos de edad. Nuestros hallazgos parecen coincidir con los propuesto por estos autores y apuntan a una leucocitopenia relativa en animales de edad avanzada que podría estar relacionada con una disfunción a nivel medular, tal y como ha sido propuesto por otros investigadores (Stanisic *et al.*, 2015).

2.3. Contajes diferenciales leucocitarios.

Los resultados porcentuales de los contajes diferenciales realizados sobre los frotis de los burros estudiados se muestran en Tabla 7.

Tabla 7. Contaje diferencia de leucocitos (%) hallados en 84 burros sanos (método manual).

Subpoblación	Media	DE	IR
Linfocitos (%)	36,1	8,0	17,8 - 50,7
Monocitos (%)	8,0	2,9	3,6 - 14,5
Neutrófilos (%)	49,9	8,9	35,9 - 68,2
Eosinófilos %	5,8	4,6	0,4 - 15,0
Basófilos (%)	0,1	0,3	0,001 - 0,9

Los intervalos de referencia fueron calculados usando los percentiles 2,5 y 97,5. DE: desviación estándar; IR: intervalo de referencia.

Inicialmente realizaremos una comparativa de los datos obtenidos en este trabajo con los reportados por otros autores que también realizaron contajes manuales diferenciales de leucocitos (Nayeri, 1978; Mori *et al.*, 2004; Yakubu y Chafe, 2008; Girardi *et al.*, 2015; Burden *et al.*, 2016). Considerando estas publicaciones, los datos obtenidos en burros de Andalucía concuerdan con los obtenidos por otros autores en otras regiones del mundo. Únicamente cabrían destacar algunas diferencias con el trabajo de Yakubu y Chafe en los contajes eosinofílicos (porcentaje muy bajo, $2,5 \pm 2,5$ %) y basofílicos (porcentajes muy elevados, $1,1 \pm 1,1$ %). De igual forma, la publicación de Nayeri, en 1978, establecía un porcentaje de monocitos llamativamente bajo, que no concuerda con los datos obtenidos por nuestro grupo ($0,4 \pm 0,7$ %). En vista de la amplia concordancia de nuestros resultados con la mayoría de publicaciones, las diferencias reseñadas podrían deberse más probablemente a fallos metodológicos en los citados artículos a la hora de reconocer las células en los frotis sanguíneos o bien a idiosincrasias de las poblaciones estudiadas.

Respecto al porcentaje de linfocitos, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$) entre machos y hembras, mostrando los machos ($42,2 \pm 6,3$ %) mayor porcentaje de linfocitos que las hembras ($35 \pm 7,8$ %). De igual forma, el grupo de burros de 6 a 10 años presentó un porcentaje significativamente ($P < 0,01$) inferior de linfocitos ($32,5 \pm 7$ %) al compararse con el resto de edades (burros de 5 años o menos: $40,2 \pm 7,4$ %; entre 11 y 15 años: $38,5 \pm 6$ %; burros mayores a 16 años: $36,3 \pm 4,5$ %).

En cuanto al porcentaje de monocitos obtenido mediante contaje diferencial, no se observaron diferencias estadísticas entre sexos ($8,1 \pm 2,8$ % en hembras; $7,6 \pm 3,2$ % en machos) ni entre grupos de edad. No obstante, al igual que con los linfocitos, los porcentajes más bajos se observaron en el grupo de burros entre 6 y 10 años ($7,7 \pm 2,9$ %).

Los porcentajes de neutrófilos obtenidos mediante contaje diferencial sobre frotis sanguíneos no mostraron diferencias según el sexo de los burros estudiados ($50,5 \pm 8,9$ % en hembras; $46,5 \pm 7,4$ % en machos). Sí que se observó un porcentaje significativamente ($P < 0,01$) más elevado de neutrófilos en los frotis de animales entre 6 y 10 años de edad ($53,7 \pm 8,8$ %) al compararse con animales más jóvenes ($45,3 \pm 5,7$ %).

En los porcentajes de eosinófilos y basófilos únicamente se observó un valor significativamente ($P < 0,05$) más elevado de eosinófilos en las hembras ($6,1 \pm 4,8$ %) respecto a los machos ($3,5 \pm 1,5$ %). Los porcentajes de basófilos, aunque no significativamente, también variaron entre sexos (0,15 % en hembras; 0,05 % en machos).

Al comparar nuestros resultados con las publicaciones más recientes en asnos observamos ciertos hallazgos específicos en nuestra población que no se han replicado en otros estudios. Así, por ejemplo, el mayor número de linfocitos en burros machos es un hallazgo no reportado para burros. Si bien este dato tendría una importancia relativa (dado que no hubo diferencias en el WBC entre género), sí que se debería tenerse en cuenta a la hora de establecerse el estado sanitario de burros machos. En el caso de la eosinofilia relativa en las hembras, este hecho sí ha sido descrito por otros autores en burros (Nayeri, 1978; Girardi *et al.*, 2015). En nuestro caso, y atendiendo a las características de las distintas explotaciones observadas durante el proceso de toma de muestras, este descubrimiento podría explicarse por un menor cuidado de las hembras en las granjas (donde la mayoría de machos se mantienen aislados y son usados como sementales, por lo que se les suele mantener en condiciones más favorables de alimentación y desparasitación) así como por el mayor contacto de las burras con animales de otras especies y con los propios ruchos (hecho que podría incrementar la carga parasitaria y explicar la eosinofilia relativa).

En el caso de la edad, no se observa en nuestro estudio una clara tendencia según la misma y únicamente en el grupo de 6 a 10 años aparecieron cambios (incrementándose el porcentaje de neutrófilos en detrimento de los monocitos y linfocitos), los cuales no parecen ser reflejo de un proceso patológico fácilmente explicable. Por tanto, según nuestros datos, alcanzaríamos la misma conclusión que la mayoría de autores que han trabajado en esta especie (salvo Zinkl y colaboradores), no pudiendo demostrar una diferencia clara en los contajes diferenciales según la edad del animal (al menos atendiendo a la estructura poblacional de los animales estudiados, pues no se incluyeron animales de menos de un año de edad). Cabría destacar que no hemos observado la tendencia al aumento en los porcentajes de eosinófilos que varios autores han reportado en asnos y han achacado al incremento exponencial en la carga parasitaria según avanza la edad en esta especie (Girardi *et al.*, 2015).

Tabla 8. Contaje diferencia de leucocitos (valores absolutos) hallados en 84 burros sanos (método manual).

Parámetro	Media	DE	IR
WBC (x10³/μL)	8,9	3,1	3,6 - 13,3
Linfocitos (x10³/μL)	3,6	1,2	1,3 - 6,1
Monocitos (x10³/μL)	0,8	0,3	0,3 - 1,5
Neutrófilos (x10³/μL)	4,9	1,4	2,3 - 7,7
Eosinófilos (x10³/μL)	0,5	0,4	0,04 - 1,5
Basófilos (x10³/μL)	0,01	0,03	0,001 - 0,1

Los intervalos de referencia fueron calculados usando los percentiles 2,5 y 97,5.
WBC=Leucocitos; DE: desviación estándar; IR: intervalo de referencia.

Tras obtenerse los WBC manuales y los porcentajes de cada subpoblación celular mediante contaje diferencial en los frotis sanguíneos, se calcularon las concentraciones absolutas (método manual) de cada población leucocitaria, que se detallan detalladas en Tabla 8. Las diferencias (atendiendo a sexo y edad) observadas para los contajes absolutos fueron similares a las ya descritas para los porcentajes de cada subpoblación. Al comparar estos datos con publicaciones anteriores, de nuevo volvemos a certificar un amplio solapamiento de los mismos (Folch *et al.*, 1997; Turnbull *et al.*, 2002 Caldin *et al.*, 2005; Laus *et al.*, 2015).

Al realizar los contajes diferenciales también se contabilizó la presencia de eritrocitos nucleados y de leucocitos rotos (*smudge cells*). En el caso de los eritrocitos nucleados, no fueron observados en ninguna de las muestras examinadas en el presente estudio. Esta ausencia concuerda con lo previamente descrito para esta especie y otros équidos, en los que muy raramente se observan reticulocitos u otros eritrocitos poco maduros en circulación, incluso bajo condiciones de regeneración medular marcada (Weiss *et al.*, 2003). Respecto a las *smudge cells*, la media fue del 3,5% del contaje leucocitario. Habría que recordar que dichas células rotas no fueron incluidas en el contaje diferencial final de las subpoblaciones leucocitarias y se descartaron para los cálculos realizados.

2.4. Evaluación de frotis sanguíneos.

No se observaron diferencias significativas en los parámetros morfológicos estudiados atendiendo al sexo o edad de los animales, así como tampoco según el estado sexual, procedencia del asno o estación y/o año de la toma de muestras. Para aquellos parámetros donde únicamente se evaluó la presencia o ausencia del mismo, las observaciones fueron las siguientes:

- Linfocitos grandes granulares: presentes en 22 animales de los 84 estudiados (26,9 %). El hallazgo de estas células circulantes en nuestras muestras concuerda con descripciones previas para équidos, en los que hasta el 5 % de los linfocitos circulantes se pueden corresponder a este subtipo (Grondin y Dewitt, 2010).

- Presencia de neutrófilos con signos de toxicidad: 7/84 burros (8,3 %). Aunque todos los asnos incluidos en el estudio fueron clínicamente sanos, el porcentaje de burros con signos de toxicidad neutrofilica en sus frotis fue sorprendentemente elevado. Si bien este hallazgo podría deberse a una activación del neutrófilo durante el almacenaje (envejecimiento celular), tal y como han descrito varios autores (Clark *et al.*, 2002; Bauer *et al.*, 2012), dichos cambios aparecieron en múltiples muestras de animales tomadas en distintas fechas. Además, tal y como se ha detallado en la sección de material y métodos, se siguió en todo momento un estricto protocolo de mantenimiento de la cadena de frío y rapidez en el análisis de las muestras. Habría que destacar que los hallazgos de toxicidad encontrados en los frotis de los burros estudiados fueron en general leves (basofilia relativa citoplasmática, ocasionales cuerpos de Döhle), sin que se llegasen a observar cambios morfológicos típicos de toxicidad extrema (como granulación tóxica, cariorrexis, etc.). Por tanto, aparte de un efecto espurio y artefactual de la conservación, podríamos hipotetizar que la presencia de cierto grado de toxicidad en neutrófilos de algunos asnos clínicamente sanos podría ser un hallazgo especie-específico sin importancia clínica, el cual habría de tenerse muy en consideración a la hora de la evaluación del frotis sanguíneo en esta especie. No obstante, también deberíamos tener en cuenta que el examen realizado a los

animales fue profundo pero no exhaustivo, por lo que no es posible descartar de forma definitiva que alguno de los animales estudiados presentase un cuadro subclínico o localizado responsable de estos cambios.

- Presencia de linfocitos activados o inmunocitos: 20/84 animales (23,8 %). En equinos, la presencia de este tipo de linfocitos circulantes ha sido frecuentemente descrita (Capomaccio *et al.*, 2011), relacionándose con cuadros de activación antigénica. La elevada prevalencia de este hallazgo en los burros estudiados podría estar relacionada con cuadros subclínicos o bien podría indicar un hallazgo idiosincrásico relativo a esta especie. Dado que este es el primer trabajo en realizar una exhaustiva compilación de estas alteraciones morfológicas en burros, no podría descartarse este último punto.

- Presencia de monocitos con el citoplasma vacuolado: 38/84 burros (45,2 %). Tal y como se comentó en la revisión bibliográfica, este hallazgo suele ser artefactual y estar relacionado con la fagocitosis por parte de los monocitos de parte del EDTA del tubo de recolección (Jain, 1993; Bienzle, 2000). No se observó correlación entre la aparición de este artefacto y el origen de la muestra, por lo que no pareció mostrar una relación directa con el tiempo de conservación de la misma en frío.

- Anisocitosis eritrocitaria: presente en 37 burros (44 %). La frecuente presencia de anisocitosis en las muestras observadas podría estar relacionada bien con la presencia de una subpoblación de microcitos (ferropenia subclínica) o con un cuadro de regeneración relativa subclínica (presencia de policromatófilos). No obstante, debido a la escasa policromasia detectada, la primera hipótesis parecería ser la correcta en la población estudiada. No obstante, no se detectó correlación entre este hallazgo y los valores de RDW, MCV o MCHC de ningún analizador. Tampoco deberíamos descartar que esta moderada anisocitosis eritrocitaria fuese un hallazgo idiosincrásico en burros especie-específico e incluso un artefacto debido a una extensión no uniforme de los eritrocitos durante la preparación del frotis sanguíneo.

- Policromasia: 11 animales (13 %). Tal y como se ha comentado anteriormente, no se detectó correlación entre esta alteración y la presencia de anisocitosis en la muestra. La policromasia observada fue muy moderada, por lo que probablemente se debiera a defectos en la tinción de los frotis. No obstante, tampoco se puede descartar que este hallazgo sea en parte una característica especie-específica del asno.

- Presencia de macroplaquetas: no se observaron en ningún burro.

- Presencia de agregados plaquetarios: 19 de los 84 burros estudiados (22,6 %). Tal y como se ha comentado con anterioridad, los agregados plaquetarios -más aún en muestras con EDTA como anticoagulante- son uno de los problemas más frecuentemente encontrados en muestras equinas (Piccione *et al.*, 2010). El resultado obtenido parece indicar que estos agregados también están presentes y pueden suponer un problema en asnos. En general dichos agregados fueron de tamaño pequeño (menos de 10) a mediano (de 10 a 20 plaquetas), siendo muy rara la presencia de grandes agregados plaquetarios en la punta de la pluma.

En cuanto a la presencia de cuerpos de Howell-Jolly, la media fue de 0,8 por 10 campos de grandes aumentos (400x). La mayoría de burros (52/84, 61,9 %) no mostraron ningún cuerpo de Howell-Jolly en los campos examinados; 17 animales (20,2 %) mostraron 1; 9 (10,7 %) 2 cuerpos y en 6 burros (7,1 %) se detectaron 3 corpúsculos de Howell-Jolly por 10 campos de grandes aumentos. En ninguno de los frotis examinados el número de cuerpos de Howell-Jolly superó a 3 por 10 campos. Este hallazgo de nuevo coincide con descripciones previas realizadas en équidos, donde la presencia de estos agregados -que normalmente se relacionan con un cuadro regenerativo- es de ocasional a muy rara (Kramer, 2000; Grondin y Dewitt, 2010).

Al realizarse la estimación del conteo plaquetario basada en el número de plaquetas medias en 10 campos de grandes aumentos (400x), la mayoría de animales (62/84, 73,8 %) presentaron de 11 a 15 plaquetas por campo; 1 animal tuvo 5 plaquetas o menos por campo; en 17 animales se observaron de 6 a 10 plaquetas por campo y 4 burros mostraron más de 15 plaquetas por campo. El número medio de plaquetas por campo en este estudio fue de 11,5. Con esta metodología, y extrapolando las publicaciones existentes en

caballos, se observa que los asnos presentan una media plaquetaria dentro de los límites inferiores descritos para caballos (10 a 30 plaquetas por campo según Kaushansky, 2008). Este mismo autor puntualiza que en caballos se puede llegar a observar individuos sanos con contajes de 6 plaquetas por campo de bajos aumentos, dato que englobaría a todos los burros de este estudio (Kaushansky, 2008).

Tal y como se ha comentado con anterioridad, el número total de plaquetas de la muestra se puede estimar también multiplicando el número medio de plaquetas por campo de bajo aumentos por 15.000 ó 20.000 (Kaushansky, 2008; Kalinkovich *et al.*, 2009). Utilizando esta fórmula obtenemos que la media de plaquetas en este trabajo fue de entre 172.200 y 229.600 plaquetas por μL , representando esta horquilla unos valores equivalentes a los previamente publicados en asnos (Girardi *et al.*, 2015; Laus *et al.*, 2015; Stanisic *et al.*, 2015; Burden *et al.*, 2016). Por tanto, como conclusión final podríamos comentar que esta estimación se acerca de forma correcta a la concentración plaquetaria real en asnos, si bien es cierto que el número obtenido no deja de ser una aproximación grosera y podría ser problemático para ciertos animales con estimaciones plaquetarias bajas. No obstante, esta metodología tendría una alta utilidad en contextos clínicos de poco acceso a equipos automáticos e instrumental.

Por último, en ninguno de los frotis realizados y teñidos con la técnica del nuevo azul de metileno se observaron reticulocitos o eritrocitos con presencia de precipitados azulados sospechosos en su interior. De nuevo esta observación viene a resaltar la ausencia de estos reticulocitos en circulación en asnos, tal y como ya se ha descrito en otros équidos (Weiss *et al.*, 2003).

3. Estudio hematológico mediante analizador de impedancia.

Los resultados obtenidos mediante el analizador de impedancia Sysmex F820 se recogen en Tabla 9. De forma más detallada, se describirán a continuación los principales hallazgos encontrados en las muestras con esta metodología, así como la comparativa según el sexo y edad de los burros. En el conjunto de estos parámetros no se detectaron

variaciones atendiendo al estado sexual, origen del animal, época o año de la toma de muestras.

Respecto al hematocrito determinado según este sistema (HCT), la media fue de 42,4 %, con una desviación estándar de 9,1 % y unos intervalos de referencia de 27,6 y 59,3 %. Este rango de referencia fue marcadamente más amplio que el obtenido con la técnica de microhematocrito y presentó una clara desviación positiva respecto a la misma. Si comparamos este rango con aquellos reportados en burros usando equipos de impedancia (Girardi *et al.*, 2015; Stanisic *et al.*, 2015) vemos que hay solapamiento con el trabajo de Girardi pero no así con el de Stanisic. En este caso, las diferencias entre los equipos utilizados podrían fácilmente explicar esta divergencia. Al ampliar la comparativa a otros trabajos con otro tipo de tecnología, sí que se mantiene mayormente el solapamiento en los rangos de referencia, si bien de nuevo se constata que los datos obtenidos con nuestro equipo de impedancia son llamativamente elevados respecto a otros trabajos. De esta comparativa podríamos deducir que el Sysmex F820 tiene una marcada tendencia a sobrevalorar (o a cuantificar al alza) el valor del hematocrito. Ya en otras especies se ha descrito un error sistemático continuo y positivo (sobrestimación) del HCT en equipos de impedancia respecto al PCV (Giordano *et al.*, 2008). No obstante, habría que recordar que en este equipo (al igual que en LaserCyte) el HCT es calculado (dependiendo su valor de una correcta evaluación del MCV y RBC), por lo que el causante último de estas variaciones sería un fallo en los contajes eritrocitarios o en la determinación del MCV. No se observaron diferencias significativas entre sexos ni entre grupos de edad, si bien los burros de más de 16 años (37,6 %) mostraron valores inferiores respecto al resto de grupos, más aún respecto a los burros de 5 o menos años (43,3 %). La ausencia de diferencias significativas según el sexo y la edad está en línea con la mayoría de publicaciones realizadas en burros (Nayeri, 1978; Laus *et al.*, 2015; Burden *et al.*, 2016.). La tendencia de los animales de mayor edad a hematocritos más bajos (como ya se había observado con la técnica del microhematocrito) podría estar relacionada con una anemia subclínica moderada (ya comentada en el apartado de los contajes manuales eritrocitarios).

El recuento de eritrocitos con este método fue de $6,4 \pm 1,6$ millones/ μL , con un intervalo de referencia entre 4,1 y 9,4 millones/ μL . Al contrario que con el HCT, el equipo de impedancia devolvió un rango de referencia en las muestras estudiadas dentro de los

datos obtenidos mediante conteo manual. Al compararse con otros estudios con equipos de impedancia, los datos obtenidos quedaron dentro de los datos publicados (Mori *et al.*, 2004; Girardi *et al.*, 2015; Stanisic *et al.*, 2015). El RBC obtenido con el equipo Sysmex de impedancia también quedó dentro de los rangos publicados para concentración eritrocitaria del resto de publicaciones en asnos (independientemente de la técnica usada). No se detectaron diferencias entre grupos de edad (si bien este valor siguió la misma distribución que la comentado para el hematocrito), pero sí que se observó un RBC significativamente ($P < 0,05$) mayor en los machos ($7,1 \pm 1,7$ millones/ μL) respecto a las hembras ($6,2 \pm 1,5$ millones/ μL). Llamativamente esta diferencia según sexo (no hallada en nuestros asnos cuando se determinaron los RBC manualmente) sí que ha sido observado por otros investigadores utilizando equipos de impedancia (Girardi *et al.*, 2015) y también puntualmente con otro tipo de equipos (Pitel *et al.*, 2006). La explicación de estos autores para esta tendencia fue la interferencia ejercida por los estrógenos en la eritropoyesis a nivel medular.

La concentración de hemoglobina obtenida con el sistema de impedancia fue de $11,9 \pm 2,6$ g/dL, siendo los intervalos de referencia de 9,5 y 14,9 g/dL. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre sexos ni entre edades (si bien de nuevo el grupo de burros de mayor edad fue el que mostró un valor más reducido). Este parámetro, al compararse con otros estudios en burros, mostró un marcado solapamiento, quedando nuestros rangos de referencia dentro de los publicados. La ausencia de variaciones en Hb atendiendo al sexo y/o edad también coincide con la mayoría de estas publicaciones, si bien ciertos autores (Nayeri, 1978; Girardi *et al.*, 2015) sí que han descrito tendencias a mayor hemoglobinemia en los machos (relacionadas con la menor concentración de estrógenos). Respecto a la edad, al igual que sucede con otros parámetros, el hecho de no haber incorporado neonatos en nuestro estudio podría también explicar el poco efecto que este factor tuvo en nuestros resultados.

El MCV con el sistema de impedancia fue de $66,9 \pm 6,9$ fL (rango de referencia: 53,3 - 79,7 fL). Estos valores quedan dentro de los rangos de referencia ya publicados para burros (Mori *et al.*, 2004; Pitel *et al.*, 2006; Laus *et al.*, 2015; Burden *et al.*, 2016), por lo que podríamos presuponer que nuestro equipo de impedancia aparentemente determinó de forma correcta el tamaño eritrocitario en asnos. Las hembras ($68,4 \pm 6,6$ fL)

mostraron un MCV significativamente superior ($P < 0,01$) a los machos ($61,4 \pm 5,2$ fL). El único estudio que observó diferencias significativas en el MCV entre sexos en burros fue el realizado por Nayeri en 1978. En el mismo, el autor expone justo el hallazgo contrario al que apareció en el presente trabajo. No obstante, Nayeri calculó el MCV mediante el método de Wintrobe (considerando el hematocrito y el conteo manual de eritrocitos para determinar el volumen unitario medio de cada glóbulo rojo), por lo que podríamos considerar dicha determinación menos exacta que la realizada por el Sysmex F820 (que sí evalúa realmente el tamaño de cada eritrocito y devuelve la media de los mismos). El mayor MCV en las hembras de nuestro estudio podría deberse (entre otras hipótesis) a una propiedad idiosincrásica de los burros de raza Andaluza. De igual forma, los animales de entre 6 y 10 años ($70,3 \pm 5,6$ fL) presentaron un MCV significativamente superior ($P < 0,01$) a los burros de 5 años o menos ($63,5 \pm 7,3$ fL), sin que se observaran otras diferencias significativas entre el resto de grupos. En este sentido, un estudio anterior centrado en grupos de edad más amplios (Laus *et al.*, 2015) ya puso de manifiesto un incremento del MCV proporcional a la edad (comparando burros de menos de 2 años de edad con burros de entre 2 y 15 años), coincidiendo por tanto parcialmente con nuestros hallazgos. Igualmente, Folch y colaboradores (1997) también señalaron un incremento del MCV en asnos relacionado con la edad.

No se hallaron diferencias significativas al comparar distintas edades o sexos en el MCHC, describiéndose los resultados en Tabla 9. Los rangos de referencia para este parámetro quedaron dentro de los referenciados anteriormente en burros (a excepción del dato anormalmente elevado de Caldin y colaboradores). Respecto al MCH, aunque, de nuevo, los valores quedaron dentro de los aportados por otros trabajos, sí que se observaron variaciones estadísticamente significativas ($P < 0,01$). Así, por ejemplo, las hembras ($19,9 \pm 6,1$ pg) mostraron una MCH mayor que los machos ($18,0 \pm 2,3$ pg). De igual forma, los burros de 5 o menos años ($17,3 \pm 2,6$ pg) presentaron una MCH inferior al resto de grupos (siendo la diferencia significativa respecto a los burros más mayores ($20,1 \pm 4,2$ pg) y los burros de entre 6 y 10 años ($21,4 \pm 7,4$ pg)). Las variaciones halladas en la MCH concuerdan con las descritas por varios autores anteriormente tanto respecto a la edad (Folch *et al.*, 1997; Laus *et al.*, 2015) como al sexo (Nayeri, 1978). Estas diferencias (al menos respecto al sexo) pueden ser achacadas a las variaciones previamente descritas para RBC (considerando la fórmula a partir de la que se calcula la MCH).

Tabla 9. Parámetros hematológicos hallados en 84 burros sanos (impedancia).

Parámetro	Media	DE	IR
HCT (%)	42,4	9,1	27,6 - 59,3
RBC (x10 ⁶ /μL)	6,4	1,6	4,1 - 9,4
Hb (g/dL)	11,9	2,6	9,5 - 14,9
MCV (fL)	66,9	6,9	53,3 - 79,7
MCH (pg)	19,4	5,7	12,1 - 23,7
MCHC (g/dL)	29,2	8,9	19,1 - 37,4
RDW (%)	16,8	4,1	6,7 - 21,1
WBC (x10 ³ /μL)	11,8	8,3	4,3 - 19,7
Lym (x10 ³ /μL)	4,2	1,6	2,1 - 7,8
Lym (%)	48,3	11,0	26,3 - 68,4
PLT (x10 ³ /μL)	236,5	88,4	93,6 - 421,3
MPV (fL)	8,7	1,2	6,2 - 10,9
Mono+Gra (x10 ³ /μL)	4,8	2,4	1,5 - 8,5
Mono+Gra (%)	51,7	11,0	30,5 - 71,9

Los intervalos de referencia fueron calculados usando los percentiles 2,5 y 97,5. DE: desviación estándar; IR: intervalo de referencia; HCT: Hematocrito; RBC: células rojas; Hb: hemoglobina; MCV: Volumen corpuscular medio; MCH: Hemoglobina corpuscular media; MCHC: Concentración de hemoglobina corpuscular media; RDW: distribución células rojas; WBC: Leucocitos; Lym y Lym%: recuento y porcentaje de linfocitos respectivamente; PLT: recuento plaquetario; MPV: volumen medio plaquetario; Mono+Gra and Mono+Gra%: recuento y porcentaje de monocitos mas granulocitos.

El RDW, según el analizador de impedancia, fue de $16,8 \pm 4,1\%$ (rango de referencia: 6,7 - 21,1%), quedando este valor entre los rangos previamente descritos para burros (Caldin *et al.*, 2005; Laus *et al.*, 2015; Burden *et al.*, 2016). Si bien no se observaron variaciones en este parámetro según el sexo, sí que se detectó una mayor ($P < 0,01$) variabilidad en el tamaño eritrocitario en burros jóvenes (menores de 6 años: $17,7 \pm 3,3\%$; entre 6 y 10 años: $17,8 \pm 2,7\%$) comparados con burros de avanzada edad (burros mayores de 15 años: $8,8 \pm 0,9\%$). Este descenso en el valor de RDW directamente proporcional a la edad del burro ha sido descrito con anterioridad (Caldin *et al.*, 2005), pudiendo el mismo ser un hallazgo idiosincrásico típico de esta especie.

En cuanto al contaje leucocitario, se obtuvo una media de $11.800 \pm 8.300/\mu\text{L}$, siendo el rango de referencia de 4.300 a 19.700 leucocitos/ μL . Este rango, dada su amplitud, coincide ampliamente con todos los estudios previamente reportados en asnos,

tanto utilizando metodologías de impedancia (Mori *et al.*, 2004; Girardi *et al.*, 2015; Stanisic *et al.*, 2015) como usando equipos más modernos (Caldin *et al.*, 2005; Laus *et al.*, 2015; Burden *et al.*, 2016). Llamativamente, este rango de referencia fue mucho más amplio que el que obtuvimos mediante contajes manuales, siendo su desviación estándar superior a la media obtenida. De esta apreciación podríamos concluir que las mediciones obtenidas mediante el equipo de impedancia fueron muy variables (incluso más que las devueltas con el método manual). En este parámetro no se detectaron diferencias estadísticamente significativas al agrupar los animales según el sexo o la edad. Trabajos anteriores con otro equipo de impedancia (Stanisic *et al.*, 2015) sí que describieron diferencias en WBC entre asnos de menos de 3 años de edad y asnos de mayor edad. De hecho, en nuestro propio estudio, usando métodos manuales, se observó la misma tendencia. La ausencia de esta variación edad-dependiente en nuestros resultados podría explicarse por idiosincrasias poblaciones o bien por diferencias en la tecnología entre los equipos utilizados. No obstante, cabe reseñar que no existe un amplio consenso respecto al efecto de la edad en la concentración leucocitaria de los asnos.

Al igual que sucedió con WBC, tampoco se observaron diferencias estadísticas asociadas al sexo o la edad para los linfocitos (expresados como porcentaje y también como contaje absoluto) ni para los granulocitos+monocitos obtenidos con este método (véanse los resultados en Tabla 9). Los rangos de referencia obtenidos para los linfocitos con el equipo de impedancia quedaron dentro de los rangos previamente reportados (tanto con equipos de impedancia -Stanisic *et al.*, 2015-, como con otros métodos -Turnbull *et al.*, 2002; Pitel *et al.*, 2006; Laus *et al.*, 2015; Burden *et al.*, 2016-). En este caso, únicamente se puede realizar una comparativa verdadera con el trabajo de Stanisic, pues el resto de estudios que usaron equipos de impedancia optaron por calcular la concentración linfocitaria basándose en el contaje manual diferencial. En cuanto a los granulocitos+monocitos, nuestro rango de referencia para este sumatorio se corresponde con el reportado por Stanisic (al sumarse en su equipo los granulocitos y las denominadas “células de tamaño medio”). De nuevo, este valor también coincide con lo reportado utilizando otros métodos. La ausencia de variaciones en las distintas poblaciones leucocitarias con el equipo de impedancia no coincide con nuestros propios hallazgos sobre contajes diferenciales (donde los machos mostraron un número significativamente mayor de linfocitos, pero menor de eosinófilos comparados con las hembras). Esto pone de manifiesto las marcadas incongruencias que pueden aparecer entre las distintas

metodologías para estos parámetros, incluso cuando se examinan las mismas muestras. Sin embargo, cabría de nuevo reseñar que las variaciones intersexuales (y entre distintas edades) para distintas subpoblaciones leucocitarias en asnos son campo de cierta controversia, con distintos autores reportando muy diversos resultados, probablemente en parte debido a idiosincrasias poblacionales, de diseño del estudio experimental y del tipo de equipo hematológico utilizado (Folch *et al.*, 1997; Pitel *et al.*, 2006; Girardi *et al.*, 2015; Laus *et al.*, 2015)

Respecto al recuento plaquetario obtenido mediante el sistema de impedancia, la media fue de $236.500 \pm 88.400/\mu\text{L}$, con unos rangos de referencia de 93.600 y 421.300/ μL . Este rango de referencia, probablemente debido a su marcada amplitud, coincide con el reportado por la mayoría de autores en burros (Caldin *et al.*, 2005; Pitel *et al.*, 2006; Laus *et al.*, 2015; Stanisic *et al.*, 2015; Burden *et al.*, 2016). No se observaron diferencias estadísticamente significativas atendiendo al sexo o edad de los animales. Esta ausencia de variaciones coincide con todas las publicaciones consultadas para asnos respecto a ambos factores.

Por último, el equipo de impedancia mostró marcadas dificultades para obtener el MPV en los animales estudiados. Así pues, únicamente devolvió este resultado en 28 de los 84 individuos testados (33,3 %). La causa más probable de este fallo específico estaría relacionada con la formación de agregados plaquetarios que impidieron al equipo obtener una medición exacta del tamaño medio plaquetario. Con las mediciones obtenidas, la media fue de $8,7 \pm 1,2 \text{ fL}$, con un intervalo de referencia de entre 6,2 y 10,9 fL. Este parámetro únicamente ha sido reportado, utilizando un equipo con tecnología de impedancia, por Stanisic y colaboradores (2015) (observándose solapamiento de los rangos entre ambos estudios). Si lo comparamos con otros estudios con equipos más modernos (Caldin *et al.*, 2005), también se observa solapamiento marcado de los rangos. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas según la edad. Respecto al sexo, si bien las medias fueron marcadamente diferentes (hembras: $8,9 \pm 1,1 \text{ fL}$; machos: $6,8 \pm 0,5 \text{ fL}$), fue imposible realizar un estudio estadístico de los datos por contar únicamente con tres mediciones del MPV en machos.

4. Estudio hematológico mediante LaserCyte.

Los resultados obtenidos mediante el analizador LaserCyte se recogen en Tabla 10. Al igual que con el resto de metodologías, no se detectaron variaciones atendiendo al estado sexual, la época o año de la toma de muestras o al origen de las mismas.

Los datos relativos al hematocrito calculado por LaserCyte (HCT) se recogen en Tabla 10. El rango de referencia para HCT con LaserCyte fue menos amplio que el obtenido por el equipo de impedancia, pero más extenso que el calculado con la técnica de microhematocrito. Esta observación podría dar una idea del amplio margen de error que este equipo mantiene en esta medición. Cuando se comparó el HCT con LaserCyte con los hematocritos reportados por otros autores se observó solapamiento de rangos de referencia en todos los casos (French y Patrick, 1995; Folch *et al.*, 1997; Pitel *et al.*, 2006; Laus *et al.*, 2015), con la excepción del ya comentado estudio de Turnbull (asnos salvajes). No se observaron diferencias significativas según el sexo ni la edad de los burros estudiados. No obstante, en lo que respecta a la edad, los animales de más de 16 años presentaron hematocritos más bajos ($30,4 \pm 2,4$ %) que el resto de grupos. Esta misma tendencia también se detectó en nuestro trabajo utilizando tanto la técnica del microhematocrito como el equipo de impedancia (ver resultados anteriores) y podría estar relacionada con la menor concentración eritrocitaria en animales de edad avanzada previamente descrita. De nuevo, cabría recordar que este analito es calculado por LaserCyte en base a RBC y MCV.

El conteo de eritrocitos (RBC) obtenido con LaserCyte mostró un rango de referencia dentro de los previamente publicados, independientemente de las técnicas utilizadas (Zinkl *et al.*, 1990; Courouce-Malblanc *et al.*, 2008; Girardi *et al.*, 2015; Laus *et al.*, 2015; Burden *et al.*, 2016). LaserCyte sí que devolvió un rango de referencia más compacto que el obtenido tanto manualmente como con el equipo Sysmex F820. Se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre machos ($6,3 \pm 0,9$ millones/ μL) y hembras ($5,8 \pm 0,9$ millones/ μL), tal y como previamente se había observado con el equipo de impedancia (aunque no manualmente). Cuando ha sido descrita por otros autores, esta variación se ha relacionado con el efecto de los estrógenos en la eritropoyesis a nivel medular (Pitel *et al.*, 2006; Girardi *et al.*, 2015). Al igual que con otras variables eritrocitarias, el grupo de burros de mayor edad mostró los valores de RBC más bajos, si

bien no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Este mismo hallazgo ya lo encontramos con las otras dos técnicas utilizadas en este estudio, pudiendo estar relacionado con un cuadro de anemia subclínica subyacente en animales de avanzada edad.

Los rangos de referencia de la hemoglobina aportados por LaserCyte en la población asnal estudiada quedaron dentro de los intervalos publicados por otros autores, independientemente del equipo utilizado (French y Patrick, 1995; Turnbull *et al.*, 2002; Girardi *et al.*, 2015; Laus *et al.*, 2015). Este rango fue muy similar al obtenido con el equipo de impedancia (9,4 - 14,5 *versus* 9,5 - 14,9), lo que se podría explicar porque ambos instrumentos detectan la hemoglobina basándose en la misma técnica (cianometahemoglobina). Respecto a la MCHC, los intervalos obtenidos con LaserCyte entran dentro de los rangos previamente publicados (Courouce-Malblanc *et al.*, 2008; Stanisic *et al.*, 2015; Burden *et al.*, 2016), si bien habría que aclarar que este parámetro no fue devuelto en 6 animales y también fue distinto al de Caldin y colaboradores (dato anormalmente elevado). Dado que la MCHC es calculada por LaserCyte basándose en los datos de hemoglobina y hematocrito (este último a su vez calculado en base al MCV y el número de eritrocitos), éste es uno de los parámetros que más depende del resto de variables y, por ello, comúnmente queda fuera del rango reconocible por el equipo. En última instancia esta variabilidad provoca que LaserCyte no aporte este valor en el análisis (aun cuando se puede calcular de forma manual). Al comparar el rango de MCHC usando LaserCyte en asnos con el que se obtuvo con el equipo Sysmex de impedancia, se observa que el mismo es marcadamente más estrecho en el equipo de tipo láser, lo cual también podría explicarse por el hecho de que LaserCyte no facilita datos extremos para MCHC. No se detectaron con esta metodología variaciones estadísticas, atendiendo al sexo o edad de los animales, ni para la concentración de hemoglobina (Hb) ni para la MCHC. Este hallazgo coincide con lo encontrado con el equipo de impedancia, si bien con el mismo sí se observó una tendencia (no significativa) a menor hemoglobina en animales más viejos.

Respecto al MCV, el intervalo de referencia con LaserCyte fue llamativamente amplio (mucho más que el obtenido con el equipo de impedancia), mostrando solapamiento con los previamente reportados por otros autores (Turnbull *et al.*, 2002; Stanisic *et al.*, 2015; Burden *et al.*, 2016), pero presentando un amplio margen hacia

valores bajos. No obstante, si evaluamos la media obtenida por LaserCyte, sí que se observa un dato muy similar a descripciones previas en esta especie (Zinkl *et al.*, 1990; Mori *et al.*, 2004; Pitel *et al.*, 2006; Courouce-Malblanc *et al.*, 2008). La amplitud del rango bajo en el MCV se debió probablemente a la presencia de 13 burros con valores inferiores a 50 fL. Este hallazgo podría estar relacionado con una microcitosis relativa en esos animales (descartable, pues no se encontraron en los mismos ningún otro parámetro fuera de la normalidad) o a un fallo en la lectura del MCV en los mismos. Al agrupar los animales por sexo, se detectaron diferencias estadísticamente significativas (hembras: $57,3 \pm 7,6$ fL; machos: $54,9 \pm 4,6$ fL; $P < 0,05$), coincidiendo con lo observado con el equipo de impedancia. Tal y como se comentó con anterioridad, este hallazgo es único de entre todas las publicaciones realizadas en asnos, pudiendo deberse (entre otras hipótesis) a una propiedad idiosincrásica de los burros de raza Andaluza. No se observaron variaciones del MCV en LaserCyte respecto a la edad, no siguiéndose por tanto la pauta que marcaban los datos con el sistema de impedancia o lo descrito por algunos autores previamente (Folch *et al.*, 1997; Laus *et al.*, 2015). En este punto habría que destacar que una de las principales diferencias entre los sistemas de impedancia y los equipos con láser es la tecnología usada para la detección del tamaño del glóbulo rojo, lo cual explicaría la falta de similitud entre este resultado al usar distintas técnicas.

Respecto a la MCH, los rangos con LaserCyte fueron muy similares a los obtenidos con el equipo Sysmex de impedancia y entraron dentro de los previamente reportados (French y Patrick, 1995; Folch *et al.*, 1997; Laus *et al.*, 2015; Stanisic *et al.*, 2015). Al igual que con el MCV, la MCH varió según el sexo de los animales (hembras: $20,6 \pm 2,6$ pg; machos: $19 \pm 1,7$ pg; $P < 0,05$) -al igual que se observó con el equipo Sysmex-, pero no según la edad de los mismos (diferencia respecto a los resultados del equipo de impedancia). Esta diferencia en el MCH según el sexo ha sido ya previamente descrita en burros (Nayeri, 1978).

En cuanto al RDW reportado por LaserCyte, mostró un rango más estrecho que el obtenido con el equipo de impedancia, quedando encuadrado el mismo dentro de los previamente reportados en burros (Caldin *et al.*, 2005; Laus *et al.*, 2015; Burden *et al.*, 2016). Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre el valor en animales de menos de 6 años ($20,6 \pm 2,4$ %) y los burros de 11 a 15 años (19 ± 1 %) y burros mayores a 15 años ($19,7 \pm 1,9$ %), sin observarse variaciones según el sexo de los

animales estudiados. Este descenso en el RDW dependiente de la edad fue ya descrito por Caldin y colaboradores, en 2005 y se asemeja al observado en nuestro trabajo utilizando el equipo de impedancia.

Tabla 10. *Parámetros hematológicos hallados en 84 burros sanos (LaserCyte).*

Parámetro	Media	DE	IR
HCT (%)	33,1	5,4	22,2 - 42,9
RBC (x10⁶/μL)	5,9	0,9	4,2 - 7,4
Hb (g/dL)	11,8	1,4	9,4 - 14,5
MCV (fl)	56,9	7,3	36,1 - 67,1
MCH (pg)	20,3	2,5	16,3 - 24,9
MCHC (g/dL)	34,9	2,4	26,2 - 38,2
RDW (%)	20,3	3,1	16,9 - 27,4
WBC (x10³/μL)	10,1	3,3	4,9 - 17,8
Lym (x10³/μL)	4,4	1,9	1,9 - 8,9
Mono (x10³/μL)	0,8	0,5	0,3 - 1,9
Neu (x10³/μL)	4,2	1,9	0,7 - 7,5
Eos (x10³/μL)	0,5	0,3	0,01 - 1,2
Baso (x10³/μL)	0,1	0,02	0,01 - 0,1
Lym% (%)	43,8	12,2	23,3 - 69,5
Mono% (%)	9,1	7,1	3,8 - 31,8
Neu% (%)	41,2	13,9	7,1 - 62,5
Eos% (%)	5,4	3,1	0,1 - 11,5
Baso% (%)	0,5	0,2	0,01 - 0,8
PLT (x10³/μL)	220,9	89,6	53,7 - 354,1
MPV (fl)	6,9	1,5	5,1 - 10,9
PDW (%)	19,9	1,8	16,2 - 23,7
PCT (%)	0,1	0,1	0,02 - 0,2
Mono+Gra (x10³/μL)	5,7	2,0	2,4 - 12,1
Mono+Gra% (%)	56,3	11,3	35,9 - 79,6

Para el LaserCyte, Mono+Gra y Mono+Gra% fue calculado sumando los recuentos y porcentajes de monocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos respectivamente. Los intervalos de referencia fueron calculados usando los percentiles 2,5 y 97,5. DE: desviación estándar; IR: intervalo de referencia. HCT: hematocrito; RBC: células rojas; Hb: hemoglobina; MCV: Volumen corpuscular medio; MCH: Hemoglobina corpuscular media; MCHC: Concentración de hemoglobina corpuscular media; RDW: distribución células rojas; WBC: Leucocitos; Lym y Lym%: recuento y porcentaje de linfocitos respectivamente; Mono y Mono%: recuento y porcentaje de monocitos respectivamente; Neu y Neu%: recuento y porcentaje de neutrófilos respectivamente; Eos y Eos%: recuento y porcentaje de eosinófilos respectivamente; Baso y Baso%: recuento y porcentaje de basófilos respectivamente; PLT: recuento plaquetario; MPV: volumen medio plaquetario; PDW: distribución plaquetaria; PCT: plaquetocrito; Mono+Gra y Mono+Gra%: recuento y porcentaje de monocitos mas granulocitos.

Los contajes de leucocitos totales obtenidos con LaserCyte mostraron un intervalo de referencia más estrecho que el obtenido con el Sysmex F820, pero más amplio que con los contajes manuales. Al compararlos con los previamente reportados en burros (Folch *et al.*, 1997; Caldin *et al.*, 2005; Laus *et al.*, 2015; Burden *et al.*, 2016), el solapamiento fue amplio y la media muy similar. Con este equipo, el valor de WBC varió atendiendo al sexo (hembras: $9.654 \pm 2.930/\mu\text{L}$; machos: $11.920 \pm 4.186/\mu\text{L}$; $P < 0,05$), así como a la edad (diferencia estadísticamente significativa $-P < 0,01-$ siendo el contaje mayor en burros más jóvenes, con $12.020 \pm 3.054/\mu\text{L}$, que en el resto de grupos). Cabría recordar que, con el equipo de impedancia, no se observaron diferencias según estos factores y únicamente en animales más viejos se detectó un menor WBC al usar la técnica manual. Estas discrepancias podrían explicarse por las distintas técnicas utilizadas en cada metodología para el reconocimiento leucocitario, que también serían las responsables de las diferencias entre medias y rangos según el equipo usado. La tendencia en animales de edad avanzada a un menor WBC ya ha sido descrita en asnos por diversos autores (Zinkl *et al.*, 1990; Folch *et al.*, 1997; Girardi *et al.*, 2015; Stanisic *et al.*, 2015) y se ha relacionado con una probable disfunción a nivel medular. En cuanto a las diferencias observadas atendiendo al sexo, nuestros hallazgos con LaserCyte difieren de los descritos previamente en burros, ya que la mayoría de trabajos no han hallado variaciones de este parámetro atendiendo al sexo del animal (Folch *et al.*, 1997; Girardi *et al.*, 2015). Este hallazgo podría deberse a una condición idiosincrásica de la población estudiada o del analizador utilizado -más aun considerando que no se repitió al utilizar otras metodologías-.

En cuanto a los contajes de las distintas subpoblaciones leucocitarias (absolutos, al igual que con los porcentuales) realizados por el equipo LaserCyte, los resultados están reflejados en Tabla 10. Los rangos de referencia (tanto en porcentaje como en número total) mostraron solapamiento con los obtenidos de forma manual, así como con los resultados en el equipo de impedancia (en este caso únicamente se compararon los rangos para linfocitos y la suma de monocitos y granulocitos). Los intervalos con LaserCyte sí que fueron marcadamente más amplios, sobre todo en el caso de las poblaciones linfocitarias y neutrofílica. Si dichos intervalos de referencia se comparan con los reportados por otros autores en asnos (French y Patrick, 1995; Folch *et al.*, 1997; Girardi *et al.*, 2015; Burden *et al.*, 2016), de nuevo se detecta un amplio solapamiento que, no obstante, se debe mayormente a los amplios rangos aportados con LaserCyte. Tal y como

sucediera con alguno de los anteriormente detallados parámetros, la amplitud de estos rangos con LaserCyte mayormente se debió a la aparición de animales con subpoblaciones *outliers*.

Tanto en porcentaje como en número absoluto, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas relacionadas con el sexo o edad en las poblaciones de neutrófilos, monocitos y eosinófilos. En los contajes de linfocitos y basófilos se observó un valor significativamente ($P < 0,05$) más elevado en machos que en hembras. Estos resultados coinciden respecto a los contajes linfocíticos con los observados utilizando contajes diferenciales manuales, tal y como se ha detallado anteriormente. No obstante, al usar LaserCyte ya no aparecieron las variaciones descritas a nivel eosinofílico (mayores en hembras con el contaje manual) e incluso con los basófilos la tendencia se invirtió. Tal y como se ha comentado en la sección de revisión bibliográfica, estas diferencias en el reconocimiento celular son frecuentes al utilizar analizadores hematológicos en veterinaria, prevaleciendo en todo caso los resultados del contaje manual, que suele considerarse como *gold standard*. En última instancia, hemos de recordar que cada analizador automático presenta un *software* de diferenciación leucocitaria que discrimina las subpoblaciones en base a unos valores *cut-off* pre-establecidos de tamaño y complejidad interna (en ambos analizadores el *software* utilizado -por inexistencia de específico para asnos- fue el de caballos). Respecto a la edad, de nuevo fueron las subpoblaciones de linfocitos y basófilos las únicas que mostraron diferencias significativas. En ambos casos el grupo de burros más jóvenes mostró una concentración superior ($P < 0,01$) respecto al resto de grupos. Este hallazgo podría estar relacionado con el método de detección de LaserCyte, pues contrasta claramente con las observaciones con otras técnicas y podría poner de manifiesto la escasa correspondencia entre metodologías para este tipo de parámetros.

Todos los parámetros plaquetarios medidos por este equipo (PLT, MPV, PDW y PCT) mostraron solapamiento en sus rangos de referencia con otros estudios en asnos (Caldin *et al.*, 2005; Courouce-Malblanc *et al.*, 2008; Burden *et al.*, 2016). No se detectaron diferencias significativas al agrupar a los animales atendiendo al sexo o edad, al igual que en la mayoría de trabajos anteriores y en este mismo estudio utilizando el equipo de impedancia.

Tal y como se detalló en la sección de material y métodos, también se recopilaron los *scattergramas* de rojos y plaquetas y de leucocitos y se anotaron las posibles alarmas o *flags* presentes en la medición. El análisis del efecto de las distintas alarmas sobre la medición con LaserCyte se discutirá en las siguientes secciones.

Por último, durante las mediciones con LaserCyte, y para comprobar la fiabilidad en el funcionamiento del *software* de caballos, se realizaron de forma aleatoria e intercalada entre las mediciones un total de 20 análisis de muestras de sangre de caballos clínicamente sanos. En dichos “controles” todos los parámetros testados estuvieron dentro del rango sugerido por el equipo y no apareciesen alertas asociadas.

En Tabla 11 se recogen, a modo de resumen y recopilación, las diferencias hematológicas halladas en asnos de nuestro estudio atendiendo a la edad y el sexo y que fueron comunes (o mayormente presentes) a las distintas técnicas utilizadas.

Tabla 11. Variaciones hematológicas halladas en 84 burros sanos respecto al sexo y edad (método manual, impedancia y LaserCyte).

Parámetro	Efecto de la edad	Efecto del sexo
PCV o HCT	↑ en jóvenes (tendencia)	-
RBC	↑ en jóvenes (tendencia)	↑ en machos
Hb	↑ en jóvenes (tendencia)	-
MCV	-	↓ en machos
MCH	-	↓ en machos
MCHC	-	-
RDW	↑ en jóvenes	-
Leucocitos	↑ en jóvenes	-
Linfocitos	-	↑ en machos
Monocitos	-	-
Neutrófilos	-	-
Eosinófilos	-	↑ en hembras
Basófilos	-	-
Recuento Plaquetario	-	-
MPV	-	-
PDW	-	-
PCT	-	-

HCT: hematocrito; RBC: células rojas; Hb: hemoglobina; MCV: Volumen corpuscular medio; MCH: Hemoglobina corpuscular media; MCHC: Concentración de hemoglobina corpuscular media; RDW: distribución células rojas; MPV: volumen medio plaquetario; PDW: distribución plaquetaria; PCT: plaquetocrito.

5. Validación del sistema LaserCyte en muestras de burros.

5.1. Exactitud en muestras asnales.

Las desviaciones (expresadas como porcentaje) obtenidas para cada parámetro en cada técnica respecto al estándar se recogen en Tabla 12.

➤ 5.1.1. Variables eritrocitarias.

Dado que dentro de las variables eritrocitarias únicamente se utilizó el PCV como *gold standard*, este fue el único parámetro para el que se analizó la exactitud del equipo LaserCyte. Para el resto de analitos se compararon los resultados obtenidos con LaserCyte y los hallados con el equipo de impedancia o los ofrecidos por las técnicas manuales (RBC).

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre el HCT obtenido con LaserCyte y el PCV manual. Ambas mediciones mostraron una media muy similar, siendo la desviación (*bias*, error sistemático) con LaserCyte del -0,7 % (2,1 %, expresado como porcentaje respecto a la media de mediciones). Esta desviación es similar a la previamente reportada en caninos y felinos al comparar el HCT de LaserCyte con el PCV manual (Becker *et al.*, 2008), siendo en dichas especies de +1,9 y +0,7 %, respectivamente. Llamativamente, en el caso de los asnos la desviación de LaserCyte fue negativa (subestimación), al contrario que en pequeños animales. La desviación en el HCT de LaserCyte queda dentro del rango aceptable (± 3 %) respecto al PCV previamente descrito por diversos autores (Rishniw y Pion, 2016), siendo incluso menor al obtenido en este estudio con otros equipos (6,1 %, expresado como porcentaje sobre la media de mediciones). Por último, este error sistemático es del mismo signo, pero inferior, al ya reportado en caninos por Welles y colaboradores en 2009 (-3 %). El rango de referencia reportado por el equipo láser fue ligeramente más ancho que el obtenido manualmente.

Al comparar el sistema de impedancia con el método manual sí se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$), estimándose el error del equipo Sysmex como +8,2 % (19,3 %). Este amplio error del equipo de impedancia es superior al previamente descrito para otros instrumentos con la misma técnica comparados con el PCV manual (Becker *et al.*, 2008) – 3,2 y 3,4 % en caninos y felinos, respectivamente,

con el equipo MS45; 2,2 y 3,5 % con Heska CBC; 0,8 y 3,8 % con Scil Vet ABC y 5,7 y 7,8 % con VetScan-, poniéndose de manifiesto la escasa fiabilidad de esta medición con esta metodología.

También se hallaron diferencias entre ambos equipos automáticos ($P < 0,01$), siendo el error del equipo de impedancia de +9,3 % respecto al equipo LaserCyte. En última instancia fue el equipo Sysmex el que presentó el rango más amplio de entre todas las técnicas utilizadas. Se ha de recordar que este equipo de impedancia determina el hematocrito basándose en un método de conductividad. Existen muchos factores (osmolaridad, lipemia, variaciones en proteínas totales, etc.) que pueden interferir en el cálculo del HCT en equipos de impedancia (Beautyman y Bills, 1982; Trautman y Newbower, 1983), siendo probablemente los mismos responsables de este resultado de nuestro trabajo. En última instancia, la exactitud del HCT por impedancia depende de las mediciones de MCV y RBC, por lo que, a la vista de los resultados, podríamos concluir que tanto el HCT, como RBC y MCV son mucho más exactos en el equipo LaserCyte que en Sysmex F820.

A modo de resumen, podríamos concluir que LaserCyte es muy exacto determinando el hematocrito en burros, más aún cuando se le compara con el equipo de impedancia. No obstante, en circunstancias clínicas que requiriesen un seguimiento muy estrecho y seriado de este parámetro, habría de tener en consideración la ligera desviación negativa que el mismo presenta. En cualquier otro caso clínico, esta desviación puede considerarse inapreciable considerando la variabilidad de los resultados en la lectura del microhematocrito.

LaserCyte se utilizó como estándar *de facto* respecto a RBC para la comparativa con el resto de técnicas. A pesar de no disponer de otro equipo para actuar como *gold standard* en la comparativa con LaserCyte, se ha de recordar que este instrumento muestra una muy elevada exactitud respecto a ADVIA ya demostrada en varias especies (Becker *et al.*, 2008). En este trabajo se determinó que LaserCyte mostraba un error sistemático (respecto a Advia 120) de solo 0,04 millones/ μL . En nuestro estudio, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) al comparar los tres métodos utilizados, siendo la media obtenida con LaserCyte inferior a la reportada con el sistema de impedancia (y ambas inferiores a su vez a la concentración calculada manualmente).

En este caso el rango de referencia más estrecho fue aportado por LaserCyte, siendo muy superior el intervalo hallado manualmente. Las desviaciones en RBC respecto a LaserCyte fueron de +0,5 millones/ μ L (+7,8 %) en el equipo de impedancia y de +1,6 millones/ μ L (+21,3 %) con el conteo manual. Estos resultados coinciden con estudios previos, que ponen de manifiesto una sobreestimación de RBC en diferentes equipos de impedancia (VetScan, Scil VetABC) respecto a LaserCyte en pequeños animales (Becker *et al.*, 2008). Respecto al método manual, se ha de considerar que los conteos de poblaciones absolutas con el mismo (RBC, PLT y WBC) siempre conllevan unos muy marcados errores sistemáticos, normalmente relacionados con déficits en la mezcla de la muestra, evaluación de campos microscópicos no representativos del global del animal, aparición de agregados celulares que impiden una evaluación correcta, etc. (Biggs y Macmillan, 1948).

Para el resto de parámetros eritrocitarios únicamente se estudiaron los resultados obtenidos con ambos equipos automáticos, utilizándose de nuevo LaserCyte como estándar *de facto*. Exceptuando la hemoglobina, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$) en todos los analitos entre ambos equipos, siendo la media superior en LaserCyte excepto para el MCV. Las desviaciones entre equipos fueron las siguientes (sistema de impedancia - láser): Hb +0,1 g/dL (+0,8 %); MCV +10 fL (+14,9 %); MCH -0,9 pg (-4,6 %); MCHC -5,7 g/dL (-19,5 %); RDW -3,5 % (-20,8 %). Los rangos fueron prácticamente similares en el caso de la Hb, siendo más amplios con LaserCyte para MCV y RDW, pero más estrechos para el resto de variables. En pequeños animales (Becker *et al.*, 2008), ya se puso de manifiesto una marcada diferencia en la exactitud del MCV entre LaserCyte y distintos equipos de impedancia, si bien en dicho trabajo cada uno de los instrumentos testados mostró una desviación diferente (positiva/negativa). El mismo hallazgo fue reportado por Welles y colaboradores, en 2009, si bien en este caso el MCV obtenido con LaserCyte fue superior a los resultantes con los equipos de impedancia. En el caso de la hemoglobina, los resultados con LaserCyte y equipos de impedancia también suelen ser similares en otras especies, atendiendo a los resultados de distintos autores en la bibliografía (Becker *et al.*, 2008; Welles *et al.*, 2009).

De estos resultados cabría concluir que la determinación de hemoglobina sí es extrapolable entre ambos equipos (hecho lógico dado que ambos utilizan la misma metodología para su medición y ya demostrado en veterinaria con otros analizadores), pero no así el resto de parámetros. De todos los analitos eritroides sólo RBC, Hb y MCV son independientes (y no calculados) en ambos equipos, por lo que toda la variabilidad observada en los mismos sería consecuencia de variaciones en los mismos. Dado que la Hb es extrapolable entre equipos, las variaciones en MCH, MCHC y HCT serían secundarias a los ya comentados errores entre instrumentos para RBC y MCV. LaserCyte reconoce menos eritrocitos (RBC) y de menor tamaño medio (MCV) que el equipo Sysmex, lo cual podría estar relacionado con la inclusión por parte del equipo de impedancia de algunos artefactos (dobletes, eritrocitos con su eje no alineado respecto al eje de lectura del flujo, leucocitos no correctamente lisados, pequeños agregados plaquetarios) en el conteo eritroide, tal como ya ha sido reportado por otros autores (Mohandas *et al.*, 1986). Al devolver RBC y MCV inferiores, lógicamente el HCT de LaserCyte ($HCT = RBC \times MCV$) es más bajo, siendo la MCH (Hb/RBC) y MCHC (Hb/HCT) superiores.

➤ 5.1.2. Variables leucocitarias.

En este apartado se realizó una comparativa entre las tres técnicas para WBC y el conteo de linfocitos (tanto porcentual como absoluto). El resto de subpoblaciones leucocitarias se compararon entre LaserCyte y el diferencial manual obtenido. También se realizó una comparación entre la concentración de monocitos+granulocitos (parámetro específico del equipo Sysmex) y la suma de ambas poblaciones obtenida con LaserCyte o por conteo diferencial. Se utilizaron los conteos diferenciales (porcentuales) como *gold standard*. En el resto de parámetros (WBC, conteos absolutos), el LaserCyte actuó como estándar de facto para la comparativa con el resto de técnicas.

Los WBC mostraron diferencias estadísticamente significativas entre técnicas ($P < 0,05$), siendo la concentración media del equipo de impedancia (+1.700/ μ L; +14,4 %) superior a la obtenida con LaserCyte, la cual a su vez fue mayor a la calculada manualmente (resultado manual: -1.200/ μ L; -13,4 %). Los rangos de referencia fueron más amplios en el equipo Sysmex, seguidos por LaserCyte y el método manual. En estudios anteriores con otras especies, LaserCyte ha mostrado una elevada exactitud en

WBC (comparado con Advia 120, Becker *et al.*, 2008), siendo su desviación media de 80 leucocitos por microlitro. Sin embargo, en este trabajo con muestras caninas, los contajes leucocitarios fueron prácticamente intercambiables entre los distintos analizadores automáticos (salvo el VetAutoread), lo cual no concordaría con los hallazgos en burros. Al igual que sucedió en burros, en pequeños animales también se ha observado una tendencia de varios equipos de impedancia a sobrestimar los leucocitos (Welles *et al.*, 2009). La sobrestimación de leucocitos encontrada con el equipo de impedancia podría deberse a la inclusión como tales de macropartículas no celulares, detritus, agregados plaquetarios de tamaño pequeño o medio o eritrocitos no correctamente lisados en el canal de blancos. Respecto al método manual, como ya se comentó para RBC, los contajes manuales leucocitarios suelen presentar un elevado error sistemático inherente a la técnica, por lo que en hematología veterinaria se suele considerar que el WBC obtenido con técnicas láser es más cercano a la realidad.

El porcentaje de linfocitos con LaserCyte fue superior ($P < 0,01$) respecto al contaje diferencial *-gold standard-* (error de +7,7 % expresado como diferencia neta; +17,6 % como diferencia porcentual respecto a la media), por lo que se observó una sobrestimación de los linfocitos en las muestras de burro. Varios trabajos previos que utilizaron el contaje diferencial manual como *gold standard* pusieron de manifiesto escasa exactitud en los contajes linfocitarios utilizando LaserCyte (Wenger-Riggenbach *et al.*, 2006; Welles *et al.*, 2009). De hecho, ya en equinos, se ha observado con diversos equipos una sobrestimación de los porcentajes linfocitarios respecto al contaje manual (Bauer *et al.*, 2012). Por el contrario, en el caso de caninos (Welles *et al.*, 2009), LaserCyte infraestimó el número y porcentaje de linfocitos, hallazgo justo inverso al que nuestro trabajo ha encontrado en burros. Dado que LaserCyte no dispone de un algoritmo diferencial específico para asnos y hubimos de utilizar el de caballos, la clasificación errónea de otros leucocitos como linfocitos podría deberse a diferencias entre ambas especies en el tamaño de las subpoblaciones leucocitarias. Otras posibles explicaciones a este error sistemático serían una mayor sensibilidad de los granulocitos asnales al manejo y solventes del LaserCyte, que conllevarse pérdida de granularidad y reducción en su tamaño, así como esferificación de sus núcleos. En este parámetro también se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el equipo de impedancia ($P < 0,01$) y las otras dos técnicas, mostrando este equipo un error de +12,2 % (+25,2 % respecto a la

media) respecto al gold standard. Si bien este hallazgo no ha sido constante, sí que se ha reportado que algunos equipos de impedancia (Hemavet 950) tienen cierta tendencia a sobreestimar los porcentajes linfocitarios (Welles *et al.*, 2009), tal y como sucedió en nuestro estudio. Al igual que se ha explicado para LaserCyte, este error podría deberse a la ausencia de un algoritmo específico para asnos en el Sysmex F820. Además, hemos de recordar que los equipos de impedancia no suelen estudiar la granularidad citoplasmática, reconociendo los subtipos leucocitarios en base al tamaño nuclear tras lisis. Por ello, cualquier incongruencia en los intervalos internos del software para equinos respecto a los tamaños nucleares leucocitarios en asnos, podría explicar estas variaciones (Tvedten *et al.*, 2000). El equipo de impedancia fue también el que arrojó unos rangos más amplios, seguidos de la técnica manual y el equipo LaserCyte.

El porcentaje de neutrófilos con LaserCyte también varió significativamente ($P < 0,01$, desviación de -8,7 % como valor absoluto, -21,1 % como valor porcentual) respecto al *gold standard*. En este caso la importancia y el sentido del error sistemático concuerdan con lo descrito por varios autores para muestras en pequeños animales (Papasouliotis *et al.*, 2006; Welles *et al.*, 2009) utilizando LaserCyte, así como con lo reportado para equinos con otros equipos (Bauer *et al.*, 2012). Llamativamente el error sistemático en este parámetro fue similar (pero de signo opuesto) al encontrado a nivel linfocitario. Este hallazgo podría hacernos pensar que el equipo ha mostrado errores a la hora de diferenciar neutrófilos y linfocitos, lo cual estaría relacionado con déficits a la hora de reconocer la granularidad celular (por pérdida de los gránulos durante el manejo y almacenaje o por diferencias interespecíficas en el tamaño, densidad y cantidad de los mismos) y establecer el tamaño propicio para la diferenciación entre subpoblaciones. Ya anteriormente, Papasouliotis y colaboradores habían propuesto una confusión de los neutrófilos en LaserCyte con otras subpoblaciones leucocitarias (en su caso, con los monocitos).

Por su parte, los porcentajes de monocitos (desviación LaserCyte +0,9 % -+9,9 %-) y eosinófilos (desviación LaserCyte -0,4 % como valor neto o -7,4 % como valor relativo) no mostraron variaciones significativas respecto al *gold standard*. Al comparar estos resultados con otro trabajo que determinó la exactitud de LaserCyte vs. contajes diferenciales (Welles *et al.*, 2009), observamos que las muestras de asnos arrojan las mismas desviaciones que las caninas, si bien en su estudio Welles sí encontró diferencias

estadísticas. De igual forma, otra investigación con LaserCyte observó estas mismas desviaciones respecto al conteo manual en pequeños animales (Papasouliotis *et al.*, 2006). En caballos también se observaron las mismas tendencias al comparar el conteo diferencial y los porcentajes de estas poblaciones aportados por el Advia 2120 (Bauer *et al.*, 2012), siendo sin embargo los *bias* menores (+1,5% en monocitos y -0,6 en eosinófilos). Podríamos concluir, por tanto, que en el caso de la especie asnal, tanto los monocitos como eosinófilos fueron correctamente identificados, presentando ambas poblaciones desviaciones moderadas y similares a las previamente descritas en otras especies. La tendencia de los analizadores automáticos de última generación a sobrestimar los monocitos podría estar relacionada con una falsa clasificación de células cuyo tamaño aumenta durante el manejo y almacenamiento de la muestra (imbibición de plasma, entrando en rangos del tamaño de monocitos según el *software* del equipo). A su vez, dicha sobrestimación de los monocitos y la subestimación de eosinófilos podría relacionarse con la pérdida de gránulos específicos de los granulocitos durante el manejo de la muestra. En este último punto, hemos de recordar que los eosinófilos asnales muestran ya de por sí una tendencia inherente a degranularse durante el manejo, hecho que es fácilmente observable durante la evaluación de los frotis sanguíneos en esta especie.

Por otro lado, el porcentaje de basófilos volvió a mostrar diferencias significativas ($P < 0,01$) al compararse los resultados de LaserCyte con el conteo diferencial manual (error LaserCyte +0,4 %). De nuevo, tanto la significancia de este error sistemático como el signo del mismo ya fueron reportados en pequeños animales por Welles y colaboradores. Otros investigadores, no incluyeron los resultados de esta subpoblación debido a su elevada variabilidad y aparición de datos espurios (Papasouliotis *et al.*, 2006; Bauer *et al.*, 2012). A pesar de la desviación observada relativamente baja en este trabajo, la misma se corresponde a un elevado error sistemático -expresado como porcentaje de la media de las mediciones-, del 72 %. Este muy elevado error sistemático significa que LaserCyte sobreestimó de sobremanera la población basofílica, clasificando como tales otros granulocitos (muy probablemente eosinófilos). La razón tras este hallazgo podría encontrarse, de nuevo, en la ausencia de un algoritmo de diferenciación leucocitaria específico para asnos en este equipo, lo cual impide una correcta clasificación de los mismos.

Por último, al comparar la sumatoria de monocitos y granulocitos se observaron diferencias significativas ($P < 0,01$) entre el conteaje manual y ambos equipos automáticos. El Sysmex F820 mostró una desviación del -11,3 % (-21,9 %) respecto al conteaje diferencial, demostrando una marcada subestimación de ambas poblaciones. De nuevo, habría de considerarse que los equipos de impedancia requieren una correcta lisis citoplasmática y que las distintas subpoblaciones leucocitarias presenten tamaños claramente distintos entre sí y dentro de las especificaciones de su software especie-específico (Tvedten *et al.*, 2000). En el caso de las muestras asnales, cualquiera de estos tres factores podría explicar por qué el Sysmex F820 mostró esta amplia desviación. Este parámetro también fue estadísticamente ($P < 0,01$) diferente entre ambos analizadores estudiados, siendo la desviación del equipo de impedancia de -4,6 % (+8,9 %) respecto a LaserCyte.

En lo que respecta a los conteajes absolutos de subpoblaciones leucocitarias, se ha de considerar que no existe un *gold standard* para las mismas (pues se calculan basándose tanto en el WBC como en los diferenciales). Dado que para estos parámetros se aúnan las desviaciones del WBC y de los respectivos conteajes porcentuales y, en cada una de dichas técnicas, el *gold standard* o estándar *de facto* es distinto, no se realizó un estudio estadístico profundo. Sin embargo, las diferencias fueron similares a las ya descritas para los porcentajes cuando se compararon la técnica manual con LaserCyte, siendo los errores con LaserCyte los siguientes: +800 linfocitos/ μL , -700 neutrófilos/ μL y +40 basófilos/ μL . No se detectó error total en los monocitos y eosinófilos en valor absoluto entre ambas técnicas. Respecto a las desviaciones entre ambos analizadores, las poblaciones absolutas también mostraron las mismas tendencias ya descritas.

➤ 5.1.3. Variables plaquetarias.

En este apartado únicamente se determinó la exactitud para la concentración plaquetaria y el MPV comparándose los resultados del equipo de impedancia y LaserCyte, sin por ello calcularse la exactitud propiamente (LaserCyte actuó como estándar *de facto*). No se detectaron diferencias significativas para las plaquetas (error equipo de impedancia: +16.500/ μL ó +6,9 %), pero sí para el MPV (error Sysmex: +1,8 fL; +20,7 %). En este apartado es llamativo comprobar como nuestro equipo de impedancia -aunque sólo ligeramente- sobrestimó la concentración plaquetaria respecto

a LaserCyte. En trabajos anteriores en pequeños animales (Becker *et al.*, 2008) se encontró justo lo contrario con otros instrumentos con tecnología de impedancia. De forma curiosa, en otro trabajo similar (Welles *et al.*, 2009) no se detectaron diferencias significativas entre equipos para PLT (ni tampoco respecto al Advia 120).

Tabla 12. Desviaciones encontradas en cada uno de los métodos.

Parámetro	Manual	LaserCyte	Impedancia
PCV o HCT	<i>Gold standard</i>	-2,1 %	+19,3 %
RBC	+21,3 %		+7,8 %
Hb	-		+0,8 %
MCV	-	Estándar de facto	+14,9 %
MCH	-		-4,6 %
MCHC	-		-19,5 %
RDW	-		-20,8 %
WBC	-13,4 %		+14,4 %
Linfocitos (%)		+17,6 %	+25,2 %
Monocitos (%)		+9,9 %	
Neutrófilos (%)	<i>Gold standard</i>	-21,1 %	-21,9 %
Eosinófilos (%)		-7,4 %	
Basófilos (%)		+72 %	
PLT	-	Estándar de facto	+6,9 %
MPV	-		+20,7 %

HCT: hematocrito; RBC: células rojas; Hb: hemoglobina; MCV: Volumen corpuscular medio; MCH: Hemoglobina corpuscular media; MCHC: Concentración de hemoglobina corpuscular media; RDW: distribución células rojas; WBC: Leucocitos; PLT: recuento plaquetario; MPV: volumen medio plaquetario.

5.2. Precisión en muestras asnales.

Se determinó la precisión intraensayo o *intrarun* para las distintas técnicas estudiadas. Los datos de replicación o repetitividad se recogen en Tabla 13.

Centrándonos en los datos relativos al equipo LaserCyte, los CVs observados se compararon con los previamente descritos con este equipo en otras especies (Wenger-Riggenbach *et al.*, 2006; Becker *et al.*, 2008). Para todos los parámetros se detectó que la precisión en muestras de asnos era ligeramente inferior a la reportada para pequeños animales (como ejemplo, en las publicaciones mentadas, los CVs obtenidos para HCT son de 2,6 y 3,9 %, siendo en asnos del 5,2 %). Las tendencias observadas en nuestros resultados de precisión sí que son muy similares a las ya descritas en pequeños animales

con LaserCyte, siendo los CVs mayores aquellos relacionados con el conteo diferencial leucocitario, seguido por los conteos plaquetarios y con la mayor precisión en parámetros como la Hb o los índices eritroides. Los CVs en nuestro estudio también fueron superiores a los obtenidos con otros equipos como el Advia 120, ForCyte o CELL-DYN 3500, tanto en pequeños animales como en caballos (Becker *et al.*, 2008; Cook *et al.*, 2016). No obstante, para el caso de los caballos, sí que la precisión fue similar en lo que respecta a las subpoblaciones leucocitarias, poniéndose de manifiesto la escasa repetitividad de los conteos diferenciales en equinos, se utilice el equipo automático que se utilice (Giordano *et al.*, 2008; Bauer *et al.*, 2011). Tal y como se ha comentado con anterioridad, en el caso de los burros, a la escasa precisión en equinos se le sumaría el uso de un algoritmo no específico y las posibles diferencias en el tamaño y características morfológicas leucocitarias entre asnos y caballos. Estos factores podrían explicar que el equipo, en cada medición sucesiva, clasifique de forma distinta células problemáticas.

Si consideramos el valor del 10 % como límite máximo admisible de imprecisión, todos los analitos medidos con LaserCyte fueron precisos salvo los porcentajes -y valores absolutos- de monocitos, eosinófilos y basófilos. La escasa precisión de este equipo para parámetros como el RBC ha sido ya previamente reportada por otros autores (Wenger-Riggenbach *et al.*, 2006), justificándola en pequeñas variaciones de intensidad en el láser detector. Dado que la mayoría de los índices eritroides dependen de RBC, este hecho explicaría la falta de precisión del HCT, MCH y MCHC.

Llamativamente, los CVs con el sistema de impedancia fueron en general menores a los obtenidos con LaserCyte y, de hecho, todos presentaron un valor bajo el 10%. De forma más detallada, el equipo Sysmex fue especialmente más preciso que LaserCyte respecto a los conteos leucocitarios. La causa tras este hallazgo habría de buscarse en las distintas metodologías utilizadas por ambos equipos para la determinación de subpoblación leucocitaria, siendo claramente más estable el reconocimiento por parte del equipo de impedancia (más basado en el tamaño que en el reconocimiento de características internas celulares). En última instancia habría que recordar que el hecho de que un equipo sea preciso (sus mediciones sean constantes sobre la misma muestra) no se relaciona con su exactitud (que las mediciones sean correctas), tal y como se ha encontrado para este equipo en este trabajo.

Tabla 13. Coeficientes de Variación (CV) de los diferentes parámetros hematológicos para los métodos Manual, Impedancia y LaserCyte.

Análisis hematológico	CV	CV	CV
	Manual	LaserCyte	Impedancia
PCV (%)	2,1 ± 0,9	5,2 ± 3,5	7,5 ± 4,3
RBC (x10 ⁶ /μL)	12,8 ± 2,2	8,1 ± 7,3	6,1 ± 5,1
Hb (g/dL)	ND	4,2 ± 2,2	4,4 ± 4,2
MCV (fl)	ND	1,0 ± 0,6	2,5 ± 2,1
MCH (pg)	ND	3,7 ± 2,5	5,9 ± 4,6
MCHC (g/dL)	ND	4,9 ± 5,6	7,3 ± 4,3
RDW (%)	ND	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,2
WBC (x10 ³ /μL)	10,1 ± 1,2	6,8 ± 3,1	3,1 ± 1,3
Lym (x10 ³ /μL)	ND	9,8 ± 4,7	6,4 ± 4,3
Mono (x10 ³ /μL)	ND	14,4 ± 12,2	ND
Neu (x10 ³ /μL)	ND	7,7 ± 5,7	ND
Eos (x10 ³ /μL)	ND	17,4 ± 7,6	ND
Baso (x10 ³ /μL)	ND	36,9 ± 28,7	ND
Lym% (%)	5,1 ± 2,4	5,1 ± 1,8	6,3 ± 3,6
Mono% (%)	8,9 ± 4,4	16,0 ± 11,5	ND
Neu% (%)	6,2 ± 2,5	5,6 ± 2,9	ND
Eos% (%)	10,2 ± 1,8	12,6 ± 9,4	ND
Baso% (%)	18,1 ± 9,1	38,1 ± 28,9	ND
PLT (x10 ³ /μL)	ND	7,9 ± 3,3	9,5 ± 10,8
MPV (fl)	ND	6,7 ± 5,1	5,2 ± 2,3
PDW (%)	ND	4,7 ± 3,2	ND
PCT (%)	ND	5,6 ± 4,0	ND
Mono+Gra (x10 ³ /μL)	ND	ND	6,2 ± 2,6
Mono+Gra% (%)	ND	ND	4,7 ± 1,3

PCV: Packed cell volumen; RBC: células rojas; Hb: hemoglobina; MCV: Volumen corpuscular medio; MCH: Hemoglobina corpuscular media; MCHC: Concentración de hemoglobina corpuscular media; RDW: distribución células rojas; WBC: Leucocitos; Lym y Lym%: recuento y porcentaje de linfocitos respectivamente; Mono y Mono%: recuento y porcentaje de monocitos respectivamente; Neu y Neu%: recuento y porcentaje de neutrófilos respectivamente; Eos y Eos%: recuento y porcentaje de eosinófilos respectivamente; Baso y Baso%: recuento y porcentaje de basófilos respectivamente; PLT: recuento plaquetario; MPV: volumen medio plaquetario; PDW: distribución plaquetaria; PCT: plaquetocrito; Mono+Gra y Mono+Gra%: recuento y porcentaje de monocitos mas granulocitos. ND: no determinado.

Por último, respecto a la precisión en los métodos manuales, se puede observar como la tendencia es similar a la ya descrita para otras metodologías, con menores CVs en el hematocrito (técnica característicamente muy estable a la hora de arrojar datos

repetidos, más aún cuando el lector tiene cierta experiencia), y CVs más elevados para los contajes absolutos de rojos y blancos (los factores que afectan a la precisión de esta técnica han sido detallados ya anteriormente -Biggs y Macmillan, 1948-) y los contajes diferenciales. En estos últimos parámetros hemos de repetir algunas consideraciones ya comentadas en el apartado de revisión bibliográfica como causantes de baja precisión: evaluación de áreas de frotis no representativas de la población total en el mismo, distribución no homogénea de los subtipos celulares durante la realización de la extensión sanguínea, etc. No obstante, nuestros resultados son muy precisos si se les compara con la bibliografía existente (Cartwright, 1973; Harvey, 2012), lo cual estaría relacionado con el alto entrenamiento en la clasificación de subtipos celulares por parte de los evaluadores. La mayor imprecisión en las poblaciones proporcionalmente menos numerosas (eosinófilos, basófilos) también ha sido ya reportada (Cartwright, 1973; Harvey, 2012).

5.3. Error total con LaserCyte en muestras de burro.

Únicamente se obtuvo el error total calculado (TEc) en aquellos parámetros en los que la exactitud fue determinada respecto a un *gold standard*. Este parámetro se calculó de acuerdo a las últimas indicaciones publicadas para medicina veterinaria (Rishniw y Pion, 2016). Los resultados del TEc con LaserCyte y la comparativa con distintas referencias de error total admisible (TEa) en veterinaria, así como los valores sigma y QGI para cada analito se muestran en Tabla 14.

Tabla 14. Comparativa del Error Total obtenido con LaserCyte y el admisible, así como los valores sigma y QGI para cada analito.

Parámetro	Bias	CV	TEc	TEa Rishniw	TEa Cook	Valor Sigma (σ)	QGI
HCT	2,1	5,2	12,5	10,0	12,8	2,1	0,3
Linfocitos (%)	17,6	5,1	27,8	10,0	25,0	1,5	2,3
Monocitos (%)	9,9	16,0	41,9	7,0	20,0	0,6	0,4
Neutrófilos (%)	21,1	5,6	32,3	10,0	20,0	-0,2	2,5
Eosinófilos (%)	7,4	12,6	32,6	20,0	25,0	1,4	0,4

Basófilos (%)	72,0	38,1	148,2	50,0	-	-	1,3
----------------------	------	------	-------	------	---	---	-----

HCT: hematocrito; CV: coeficiente de variación; TEc: error total calculado; TEa: error total admitido.

Se puede observar que los errores totales obtenidos con LaserCyte fueron superiores para todos los parámetros determinados a los considerados como aceptables en hematología veterinaria. En el caso del HCT y los contajes linfocitarios, el valor sí que se acercó a la admisibilidad, si bien siempre se mostró en rangos elevados de error total. La cercanía (e incluso inclusión) del TEc del HCT dentro de los TEa para pequeños animales sí que determina un muy buen rendimiento de LaserCyte para este parámetro en asnos.

Se ha de considerar que ambas publicaciones referenciadas (Cook *et al.*, 2016; Rishniw y Pion, 2016) están enfocadas a pequeños animales y han testado equipos de gama alta, por lo cual este hallazgo no es sorprendente. Es por ello por lo que otra conclusión que podríamos trazar sería la necesidad de establecer TEa específicos para esta especie (y para équidos en general) ya que, incluso parámetros que con muy buen rendimiento (como el HCT), incumplen las exigencias trazadas para pequeños animales. De hecho, una revisión detallada de los resultados de otros autores (utilizando equipos de mayor gama que LaserCyte), comparándose con los TEa exigidos por Cook y/o Rishniw, también arroja resultados similares a los nuestros. Así, en muestras caninas el TEc para HCT se acercó al 10 % en algunos estudios (Bauer *et al.*, 2011, 2012), siendo incluso superior a nuestro dato en felinos. Para los contajes diferenciales también se observaron TEc fuera de los rangos aceptables con equipos como el Syxmex XT 2000Iv, CellDyn 3500 y Advia 2120 (Neuerer, 2005; Becker *et al.*, 2008; Lilliehook y Tvedten, 2009a,b; Bauer *et al.*, 2011, 2012;), así como en el propio trabajo de Rishniw y Pion. En todos estos estudios se observó la misma tendencia que ya hemos descrito para LaserCyte en asnos, con menores TEc en HCT, seguidos por las distintas subpoblaciones leucocitarias (y especialmente altos TEc en monocitos y eosinófilos), hallazgo que también observaron Rishniw y Pion en 2016.

Debido a que el análisis con LaserCyte en asnos no arrojó TEc aceptables, se calculó el índice sigma para estos analitos. En todos ellos el valor de sigma fue inferior a 3, lo cual indicaría el escaso nivel de admisibilidad de los resultados de LaserCyte en

asnos. Estos valores bajo 3 (rendimiento pobre) fueron también los mayoritarios en el trabajo de Rishniw y Pion (utilizando varios equipos de alta gama).

Debido a la existencia de analitos con valores sigma bajo 3, se calculó el QGI, obteniéndose las siguientes resultados:

- La falta de precisión (parámetro exacto, pero poco repetible) fue el principal problema para HCT, monocitos y eosinófilos.
- La falta de exactitud fue el principal componente del error sistemático para linfocitos, neutrófilos y basófilos (estos últimos en mucha menor medida).

Varios autores ya han reportado previamente que el principal componente de error para el HCT es la imprecisión (Dewhurst *et al.*, 2003; Becker *et al.*, 2008), independientemente del equipo utilizado. Estas conclusiones coincidirían con nuestro hallazgo y podrían estar relacionados con pequeñas variaciones en el cálculo del HCT secundarias a errores en la determinación de RBC y MCV. Respecto a monocitos y eosinófilos, al ser las poblaciones menos numerosas, es lógico que la imprecisión sea el mayor componente de error (por el elevado CV inherente a datos con medias muy bajas). No obstante, de forma genérica, podríamos afirmar que, en asnos y con LaserCyte, el principal componente del error fue la inexactitud. Cook y colaboradores ya pusieron de manifiesto esta misma idea estudiando varios equipos automáticos. Este hallazgo, tal y como ya hemos comentado, se podría deber a los problemas en el reconocimiento celular en burros por parte del equipo LaserCyte (en gran parte probablemente por el uso de un algoritmo no específico).

Este patrón en los distintos parámetros, respecto al QGI, fue muy similar al observado en felinos en un trabajo anterior con el XT 2000iV de Sysmex (Lilliehook y Tvedten, 2009a,b), por lo que parece que los tipos de errores son similares en ambas especies entre estos dos equipos.

Por último, deberíamos de nuevo recordar que sería necesario establecer TEa, índices sigma y QGI específicos para equinos (e incluso para asnos), siendo muy probable que ningún equipo hematológico veterinario a disposición en la actualidad pueda alcanzar niveles publicados como aceptables basándose en estudios de patología clínica veterinaria.

5.4. Grado de acuerdo de LaserCyte con otras técnicas en muestras de sangre asnal.

Se comenzará con la presentación de resultados y discusión del grado de acuerdo entre las técnicas manuales y los resultados de LaserCyte. En Figura 6 se recogen los gráficos de Bland-Altman para todos los analitos testados con ambas técnicas, mientras que en Figura 7 se representan las regresiones de Passing-Bablok y en Tabla 15 se recogen los datos de intercepción, pendiente, sus respectivos intervalos de confianza al 95% y los coeficientes de correlación de concordancia para esta comparativa. Las ecuaciones de regresión para cada parámetro aparecen integradas en cada gráfico de Passing-Bablok.

Al analizar los Bland-Altman de esta comparativa, podemos comprobar como los intervalos de confianza al 95% son en general muy extensos. El nivel de inexactitud (en el gráfico representado por la línea continua) se corresponde con los datos previamente presentados.

Tabla 15. *Correlación, Intercepción, pendiente e intervalos de confianza al 95% para ambos parámetros de las regresiones Passing-Bablok entre los resultados de LaserCyte y el Método Manual.*

Parámetros hematológicos	Correlación	Intercepción	Int 95% Intercepción	Pendiente	Int 95% Pendiente
PCV o HCT	0,6	10,6	(3,6; 16,4)	0,7	(0,5; 0,9)
RBC	0,3	-9,3	(-17,7; -4,5)	2,9	(2,1; 4,3)
WBC	0,4	3,3	(1,6; 4,8)	0,6	(0,5; 0,8)
Lym%	0,5	11,5	(1,3; 19,1)	0,6	(0,4; 0,8)
Mono%	0,04	1,1	(-3,8; 4,2)	0,9	(0,4; 1,6)
Neu%	0,3	23,7	(15,1; 32,9)	0,6	(0,4; 0,7)
Eos%	0,6	-1,4	(-2,8; 0,1)	1,3	(1,0; 1,7)
Baso%	0,03	-0,3	(-1,6; 0,0)	0,5	(0,0; 2,7)

HCT: hemaocrito; PCV: Packed cell volumen; RBC: células rojas; WBC: Leucocitos; Lym%: porcentaje de linfocitos; Mono%: porcentaje de monocitos; Neu%: porcentaje de neutrófilos; Eos%: porcentaje de eosinófilos; Baso%: porcentaje de basófilos.

En el caso de las regresiones para esta comparativa, primero hemos de determinar el grado de correlación existente entre parámetros (Lin, 1989). Tal y como se observa en Tabla 15, los niveles de correlación fueron de moderados a bajos, lo cual concuerda con resultados previos reportados para este analizador respecto a técnicas manuales (Papasouliotis *et al.*, 2006). En los gráficos de Passing-Bablok se puede observar como ciertos parámetros muestran estrechos intervalos al 95% (eosinófilos, monocitos, WBC) y algunos muestran una línea de regresión cercana a la línea de identidad (lo cual denota

buena exactitud entre métodos). No obstante, estos gráficos exponen muy claramente la falta de acuerdo existente en parámetros como RBC o basófilos.

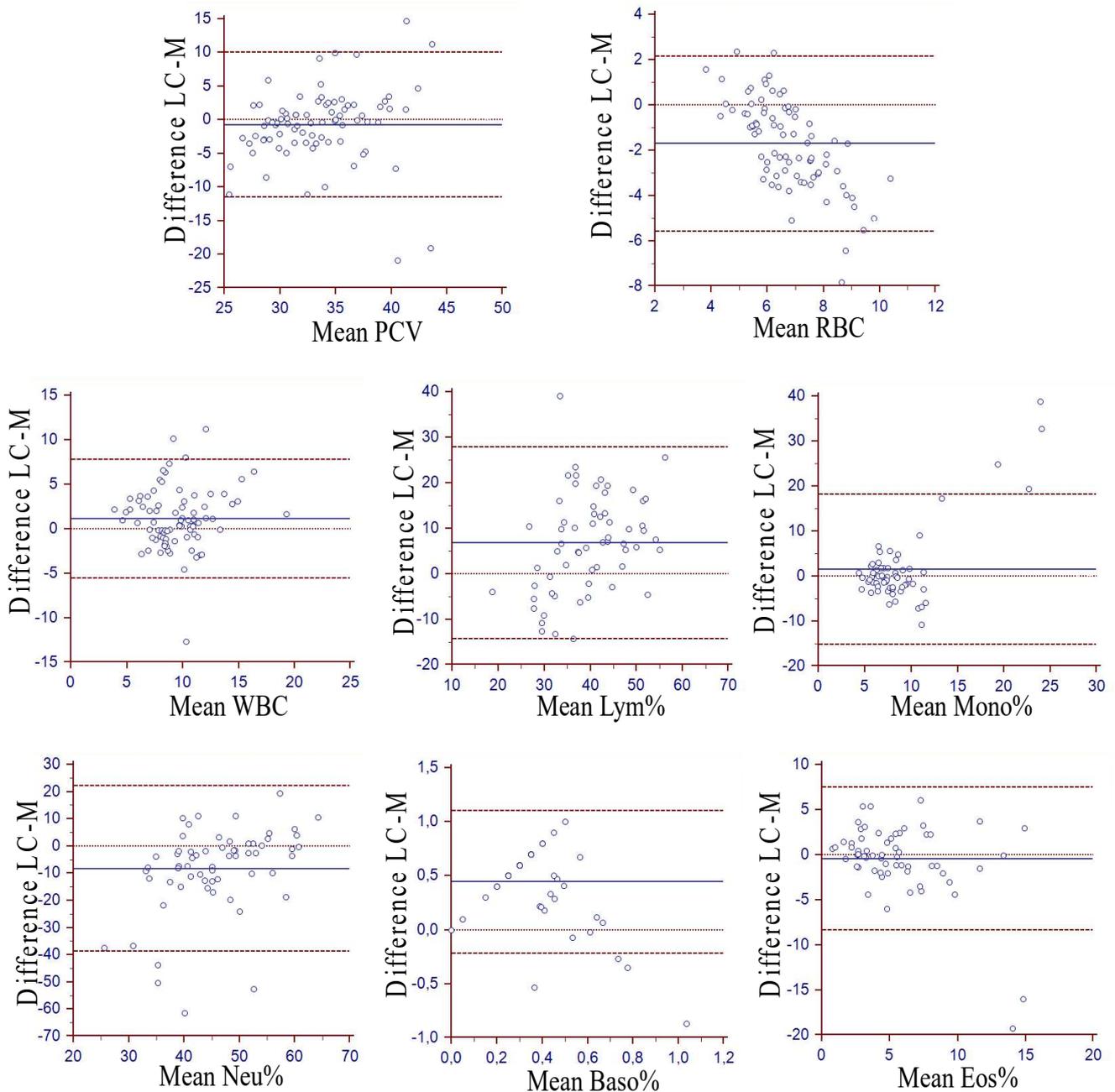


Figura 6. Gráficos de Bland-Altman comparando los resultados obtenidos con el analizador LaserCyte y el método de manual en las muestras de sangre de asno analizadas. Los ejes X representan los promedios para las 2 mediciones de ambos métodos, y los ejes Y indican la diferencia de ambas evaluaciones. La línea sólida representa la desviación media (bias), la línea punteada es igual a cero, y las líneas discontinuas indican los intervalos de confianza al 95%. LC, LaserCyte; M, método manual.

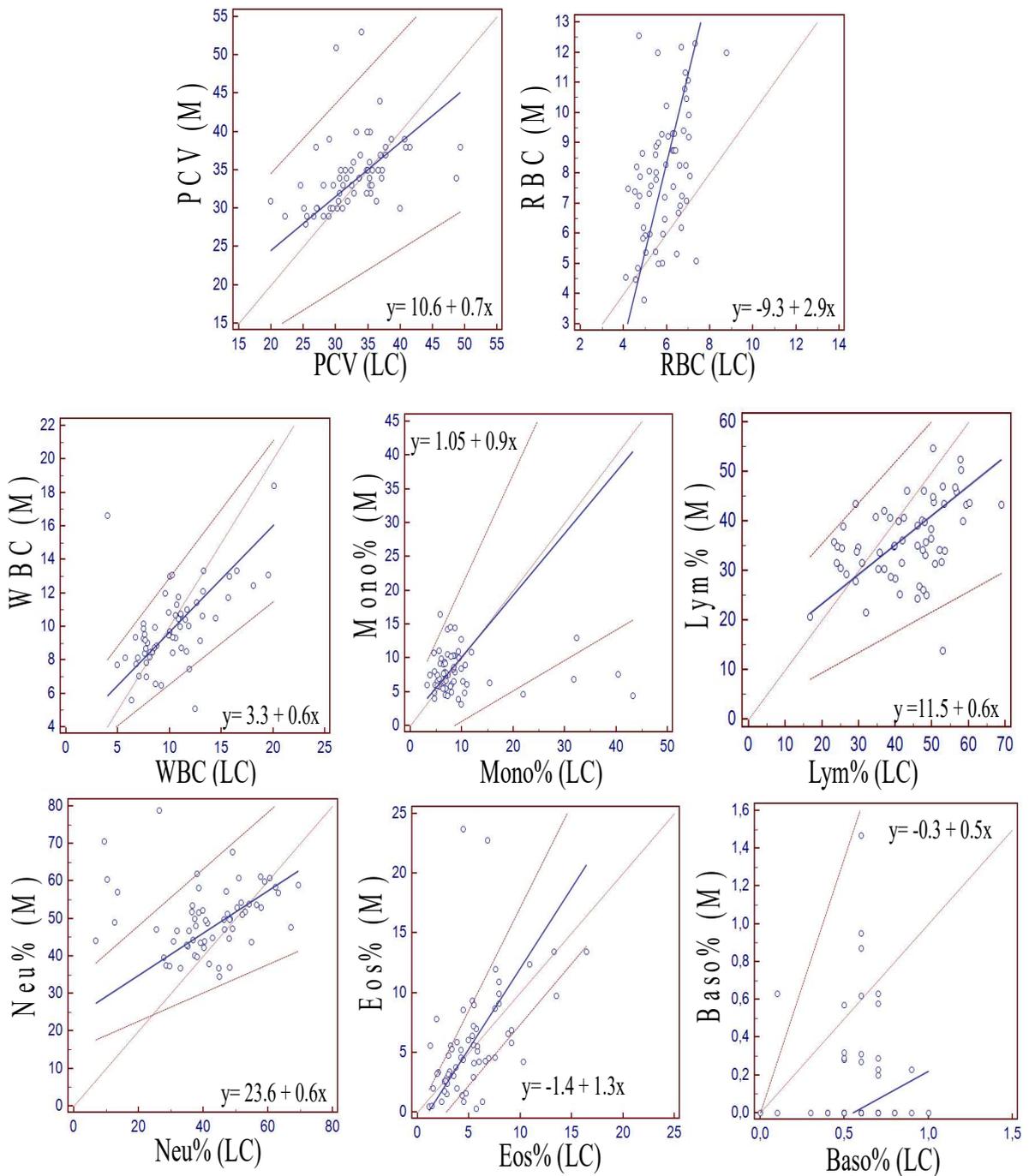


Figura 7. Regresión de Passing-Bablok entre los datos de LaserCyte y los obtenidos con técnicas manuales. La línea continua representa la línea de regresión, las líneas discontinuas representan los intervalos de confianza al 95% y la línea punteada representa la línea de identidad ($x=y$). La ecuación de regresión se detalla en el gráfico. LC, LaserCyte; M, método manual.

Siguiendo las indicaciones previamente reportadas (si los intervalos al 95% de la intercepción no comprenden el valor 0 indica la existencia de un error constante; si los intervalos al 95% de la pendiente no comprenden el valor 1 indica la existencia de un error proporcional), podemos caracterizar los errores sistemáticos presentes entre técnicas de la siguiente forma:

- HCT. El error sistemático tiene un componente constante y (en poca medida) proporcional.
- RBC. El error sistemático tiene un componente constante y proporcional.
- WBC. Igual a RBC.
- Porcentaje de linfocitos. Componente constante y proporcional.
- Porcentaje de monocitos. No existe ni error constante ni proporcional (lo cual denota que el principal elemento en el error de este analito es la imprecisión).
- Porcentaje de neutrófilos. Error constante y proporcional.
- Porcentaje de eosinófilos. Sin importancia el error sistemático (la imprecisión es la causante de la falta de acuerdo).
- Porcentaje de basófilos. Igual a los eosinófilos.

Aunque existen pocas publicaciones que hayan detallado tan profundamente los resultados comparativos entre técnicas, sí que nuestros hallazgos coinciden con el mayor peso de los errores proporcionales respecto a los constantes en la mayoría de parámetros (Rishniw y Pion, 2016). La importancia de la presencia de este error proporcional radica en el aumento del grado y peso de los errores en muestras con los analitos en rangos de mediciones altas. Por tanto, podríamos concluir que los resultados de LaserCyte en asnos pueden ser incluso menos exactos si los mismos se encuentran en rangos elevados.

Además, al igual que ya observaron ciertos autores (Becker *et al.*, 2008), en este trabajo el error sistemático del HCT también tuvo un componente principal constante (independiente del valor alcanzado por el equipo). Este hallazgo tiene importancia pues, al ser error independiente del valor resultante, los clínicos pueden obtener una estimación del hematocrito real conociendo para cada especie la desviación presente (en el caso de asnos la desviación del HCT respecto al PCV fue de 0,7 %).

Teniendo en cuenta nuestra definición previa de buen acuerdo (que no muestre errores proporcionales o constantes), únicamente los porcentajes de monocitos, eosinófilos y basófilos mostraron un buen acuerdo al comparar LaserCyte y los contajes manuales. El acuerdo estuvo cercano para PCV (HCT) y fue pobre para RBC, WBC y los porcentajes de neutrófilos y linfocitos.

La comparativa del acuerdo entre LaserCyte y el equipo de impedancia Sysmex F820 se recoge en Figura 8 (Bland-Altman) y Figura 9 (Passing-Bablok), así como en Tabla 16.

Tabla 16. *Correlación, Intercepción, pendiente e intervalos de confianza al 95% para ambos parámetros de las regresiones Passing-Bablok entre los resultados de LaserCyte y el equipo de impedancia.*

Analito	Correlación	Intercepción	Int 95% Intercepción	Pendiente	Int 95% Pendiente
HCT	0,5	-10,9	(-28,6;1,2)	1,6	(1,2; 2,1)
RBC	0,7	-0,9	(-2,5; 0,3)	1,2	(1,0; 1,5)
Hb	0,9	-1,1	(-2,3; 0,1)	1,1	(1,0; 1,2)
MCV	0,5	-2,8	(-26,1; 14,3)	1,2	(0,9; 1,6)
MCH	0,5	-7,9	(-17,0; -1,7)	1,3	(1,0; 1,8)
MCHC	-0,03	-97,1	(-315,3; -34,3)	3,6	(1,8; 9,9)
RDW	0,4	-15,8	(-43,3; -3,6)	1,7	(1,1; 3,1)
WBC	0,6	-2,3	(-5,0; 0,1)	1,1	(0,9; 1,4)
Lym	0,6	0,3	(-0,6; 1,0)	0,8	(0,7; 1,1)
Lym%	0,7	6,5	(-1,9; 14,5)	0,9	(0,7; 1,1)
Mono+Gra	0,6	-2,2	(-3,7; -1,1)	1,1	(0,9; 1,4)
Mono+Gr%	0,7	-5,9	(-18,8; 6,6)	1,1	(0,8; 1,3)
PLT	-0,1	-12,2	(-249,9; 69,2)	1,3	(0,8; 2,4)
MPV	-0,1	2,6	(-17,8; 6,4)	0,8	(0,2; 4,0)

HCT: hematocrito; RBC: células rojas; Hb: hemoglobina; MCV: Volumen corpuscular medio; MCH: Hemoglobina corpuscular media; MCHC: Concentración de hemoglobina corpuscular media; RDW: distribución células rojas; WBC: Leucocitos; Lym y Lym%: recuento y porcentaje de linfocitos respectivamente; PLT: recuento plaquetario; MPV: volumen medio plaquetario.

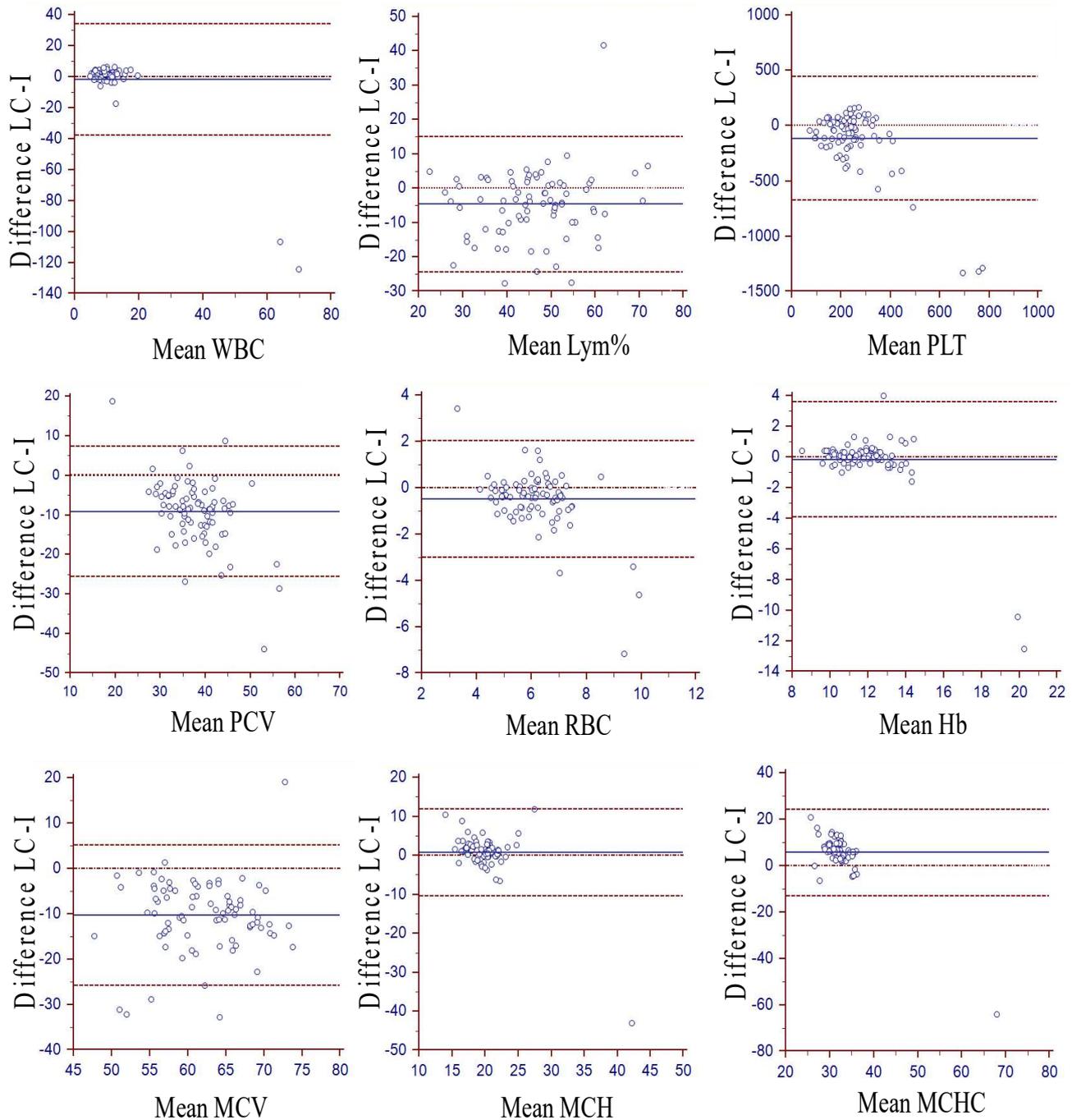


Figura 8. Gráficos de Bland-Altman comparando los resultados obtenidos con el analizador LaserCyte y el equipo de impedancia en las muestras de sangre de asno analizadas. Los ejes X representan los promedios para las 2 mediciones de ambos métodos, y los ejes Y indican la diferencia de ambas evaluaciones. La línea sólida representa la desviación media (bias), la línea punteada es igual a cero, y las líneas discontinuas indican los intervalos de confianza al 95%. LC, LaserCyte; I, método de impedancia.

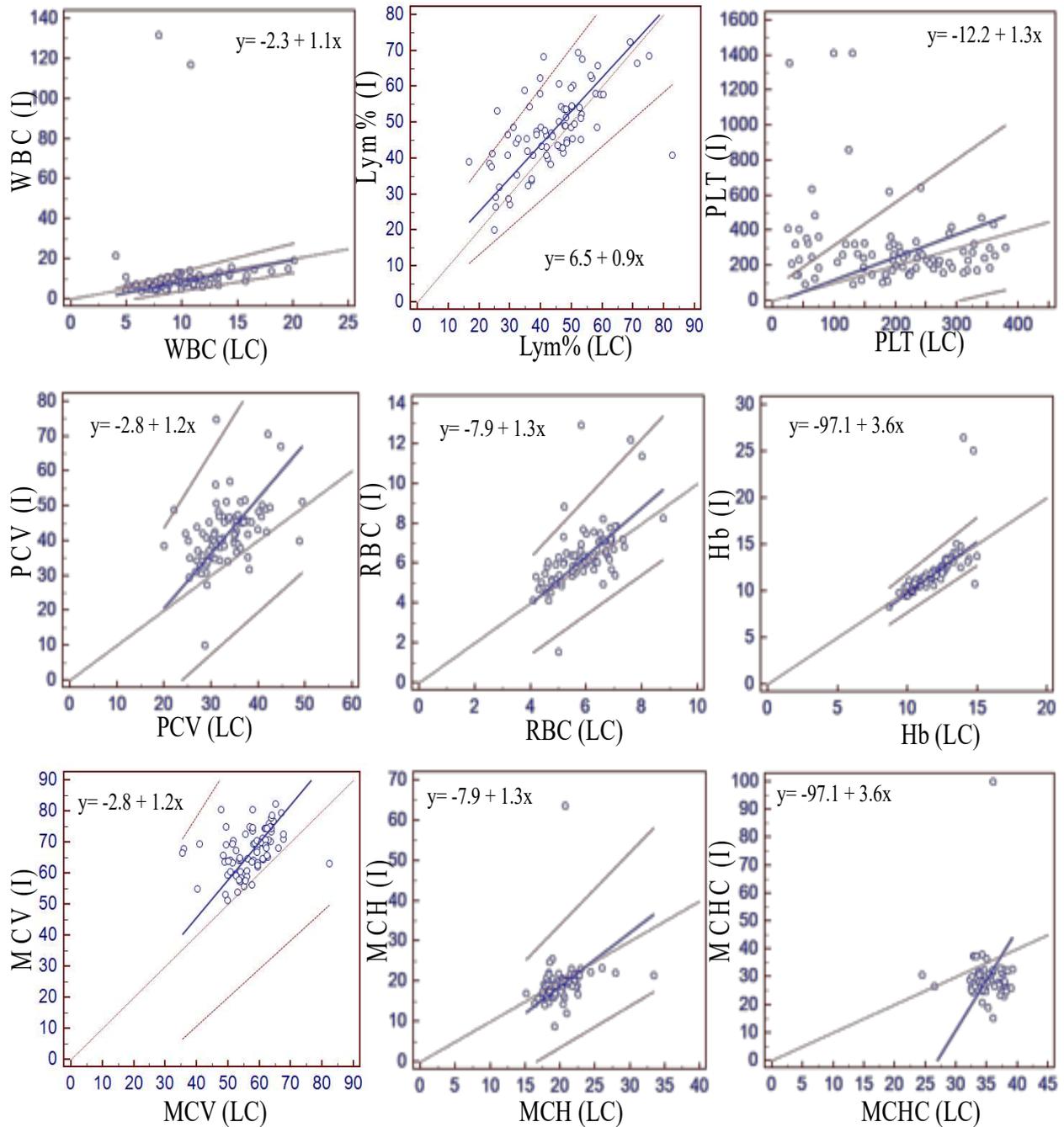


Figura 9. Regresión de Passing-Bablok entre los datos de LaserCyte y los obtenidos con técnicas manuales. La línea continua representa la línea de regresión, las líneas discontinuas representan los intervalos de confianza al 95% y la línea punteada representa la línea de identidad ($x=y$). La ecuación de regresión se detalla en el gráfico. LC, LaserCyte; I, método de impedancia.

En este caso, considerando nuestra definición previa de acuerdo, los resultados de ambos analizadores fueron extrapolables para todas las variables (buen acuerdo), salvo HCT (existencia de un error proporcional ligero), MCH y MCHC (en ambos casos, presencia de errores proporcionales y constantes).

Para un estudio más profundo de este nivel de acuerdo, se volvieron a calcular los niveles de correspondencia entre técnicas tras haber eliminado aquellas muestras que habían sido marcadas por LaserCyte con valores fuera de rango. En la mayoría de las ocasiones esto no mejoró el nivel de acuerdo entre LaserCyte y el equipo de impedancia, pero sí para ciertos parámetros al compararse LaserCyte con la técnica manual (HCT vs PVC, así como el contejo total de blancos).

De forma general, los parámetros con peor nivel de acuerdo entre distintas técnicas fueron aquellos relacionados con los leucocitos, especialmente los contajes absolutos y porcentajes de subpoblaciones leucocitarias. Este poco nivel de acuerdo entre técnicas para el diferencial leucocitario ya ha sido descrito previamente tanto en caballos como en pequeños animales (Papasouliotis *et al.*, 2006; Giordano *et al.*, 2008; Welles *et al.*, 2009). En nuestro estudio, este hallazgo estaría de nuevo relacionado con el uso de *software* con un algoritmo de diferenciación leucocitaria no especie-específico, con los consiguientes errores que ya se han comentado previamente.

5.5. Estudios de interferencia en muestras asnales con el sistema LaserCyte.

➤ Efecto de la lipemia.

En el caso de la lipemia, los resultados (media de los dos contajes de los dos animales testados) obtenidos se muestran en Tabla 17.

A la vista de nuestros resultados, se comprobaron los hallazgos previamente descritos en humana (Zeng *et al.*, 2013) así como en veterinaria (Departamento de Patología Clínica de la Universidad de Cornell, datos publicados online en la página <http://www.eclinpath.com>). Así, conforme se incrementa el nivel de lipemia en las muestras de burro se puede detectar un aumento de la Hb, MCH y MCHC, tal y como ya se ha observado en otras especies (Layton *et al.*, 1989). Inicialmente, el incremento en la hemoglobina podría ser atribuible a la hemólisis provocada por el incremento de

osmolaridad sérica secundario al aumento de lipoproteínas (Swank y Roth, 1954). Dicha hemólisis también provoca (tal y como se observan en los resultados) un descenso en RBC y HCT. Dado que el MCV se mantiene mayormente uniforme a lo largo de las mediciones, sería por tanto las variaciones en el número de rojos y en la cantidad de hemoglobina libre las responsables de los cambios en el resto de índice eritroides, tal y como se ha descrito en otras especies. Igualmente, también se detectó en burros un incremento en PLT (el cual ha sido reportado previamente en veterinaria y medicina humana y parece estar relacionado con el reconocimiento por parte del equipo de glóbulos lactecentes como plaquetas; Layton *et al.*, 1989).

Por último, a nivel de subpoblaciones leucocitarias, se detectó una tendencia progresiva a obtener mayores porcentajes (y contajes globales) de linfocitos y menores de granulocitos (más específicamente neutrófilos) conforme aumentaba la lipemia. Este hecho no ha sido descrito previamente, a conocimiento del autor. Se podría teorizar que este hallazgo estaría relacionado con el aumento de osmolaridad en el suero y la imposibilidad de los granulocitos de expandirse adecuadamente, así como una mayor tendencia de los mismos a degranularse. Ambos factores conllevarían un menor tamaño relativo y granularidad de los neutrófilos, que podría facilitar su confusión con linfocitos por parte del LaserCyte.

Tabla 17. Efecto de la lipemia en los resultados obtenidos para los diferentes parámetros hematológicos estudiados en asnos.

Índice Lipémico					
	0	1	2	3	4
Parámetros Hematológicos					
HCT (%)	37,2	36,3	32,4	29,9	18,8
RBC (x10 ⁶ /μL)	6,9	6,05	5,9	5,9	3,2
Hb (g/dL)	12,1	14,5	15,8	16,9	19,9
MCV (fl)	53,9	60,1	55,2	50,8	59,2
MCH (pg)	32,5	39,9	48,8	56,5	105,0
MCHC (g/dL)	17,6	23,9	26,8	28,6	62,3
RDW (%)	9,2	14,2	15,1	16,2	14,1
WBC (x10 ³ /μL)	9,1	9,1	9,2	8,5	8,8
Lym (x10 ³ /μL)	3,8	4,5	4,8	4,5	5,3
Mono (x10 ³ /μL)	0,6	0,6	0,4	0,4	0,4
Neu (x10 ³ /μL)	4,4	3,9	3,9	3,5	3,1
Eos (x10 ³ /μL)	0,2	0,07	0,02	0,05	0,04
Baso (x10 ³ /μL)	0,05	0,04	0,01	0,1	0,02
Lym% (%)	41,9	49,2	52,2	52,3	59,9
Mono% (%)	7,2	6,6	4,2	5,1	4,1
Neu% (%)	48,4	43,0	43,3	41,1	35,4
Eos% (%)	1,9	0,8	0,2	0,6	0,4
Baso% (%)	0,6	0,4	0,1	0,9	0,2
PLT (x10 ³ /μL)	221,0	259,0	336,0	331,0	324,0
MPV (fl)	5,4	6,9	8,5	9,9	5,9
PDW (%)	15,1	19,9	22,5	23,6	22,1
PCT (%)	0,1	0,2	0,3	0,3	0,2

HCT: hematocrito; RBC: células rojas; Hb: hemoglobina; MCV: Volumen corpuscular medio; MCH: Hemoglobina corpuscular media; MCHC: Concentración de hemoglobina corpuscular media; RDW: distribución células rojas; WBC: Leucocitos; Lym y Lym%: recuento y porcentaje de linfocitos respectivamente; Mono y Mono%: recuento y porcentaje de monocitos respectivamente; Neu y Neu%: recuento y porcentaje de neutrófilos respectivamente; Eos y Eos%: recuento y porcentaje de eosinófilos respectivamente; Baso y Baso%: recuento y porcentaje de basófilos respectivamente; PLT: recuento plaquetario; MPV: volumen medio plaquetario; PDW: distribución plaquetaria; PCT: plaquetocrito.

➤ Efecto de la hemólisis.

Para la hemólisis, los resultados del primer protocolo (efecto exclusivo del aumento de la hemoglobina libre en plasma) fueron los esperables (incremento gradual de Hb, MCH y MCHC), con mínimas elevaciones de PLT, RBC y RDW (muy probablemente por la presencia de restos celulares a pesar de las sucesivas centrifugaciones). Los resultados más interesantes aparecieron cuando se siguió el protocolo de agitación (DiMartino *et al.*, 2015), ya que el mismo sí que representó más coherentemente los artefactos que aparecen durante la hemólisis artefactual o *in vitro* de la muestra. Dichos resultados se recogen en Tabla 18 (media de los dos contajes de los dos animales testados).

La hemólisis provocó un aumento de la hemoglobina libre e incremento en los índices dependientes de la misma (MCH, MCHC), así como una (lógica) reducción en RBC y HCT. La presencia de fragmentos eritroides quedó patente por la disminución del MCV e incremento del RDW, así como por un significativo aumento de PLT. A nivel leucocitario volvieron a observarse (al igual que en la lipemia) incrementos en los linfocitos y reducción en los granulocitos (neutrófilos y eosinófilos), que podrían explicarse por degranulación de estas últimas células o no reconocimiento de los gránulos citoplasmáticos por problemas con el láser y la densidad del medio. Estos hallazgos coinciden plenamente con descripciones previas en medicina humana y veterinaria (Weiser, 2012, Departamento de Patología Clínica de la Universidad de Cornell), si bien las variaciones a nivel leucocitario sí que parecen más específicas de LaserCyte y habrían de tenerse en consideración cuando se trabaje sobre muestras con estas sustancias interferentes.

Tabla 18. Efecto de la hemólisis en los resultados obtenidos para los diferentes parámetros hematológicos estudiados en asnos.

Índice hemólisis	0	1	2
	Parámetros hematológicos		
PCV (%)	35,1	31,1	27,8
RBC (x10 ⁶ /μL)	6,1	6,01	5,1
Hb (g/dL)	11,1	16,6	24,4
MCV (fl)	57,2	51,9	54,2
MCH (pg)	31,6	53,3	87,7
MCHC (g/dL)	18,0	27,6	47,5
RDW (%)	8,5	16,6	15,9
WBC (x10 ³ /μL)	10,2	9,1	6,5
Lym (x10 ³ /μL)	3,7	4,4	3,04
Mono (x10 ³ /μL)	0,9	0,9	0,6
Neu (x10 ³ /μL)	4,6	3,6	2,6
Eos (x10 ³ /μL)	0,9	0,1	0,2
Baso (x10 ³ /μL)	0,01	0,1	0,05
Lym% (%)	36,2	48,1	46,7
Mono% (%)	9,3	9,9	9,4
Neu% (%)	45,5	39,9	40,2
Eos% (%)	8,9	1,2	2,9
Baso% (%)	0,1	0,9	0,8
PLT (x10 ³ /μL)	255,0	309,0	305,0
MPV (fl)	5,1	5,8	5,5
PDW (%)	13,1	18,1	12,4
PCT (%)	0,1	0,2	0,2

HCT: hematocrito; RBC: células rojas; Hb: hemoglobina; MCV: Volumen corpuscular medio; MCH: Hemoglobina corpuscular media; MCHC: Concentración de hemoglobina corpuscular media; RDW: distribución células rojas; WBC: Leucocitos; Lym y Lym%: recuento y porcentaje de linfocitos respectivamente; Mono y Mono%: recuento y porcentaje de monocitos respectivamente; Neu y Neu%: recuento y porcentaje de neutrófilos respectivamente; Eos y Eos%: recuento y porcentaje de eosinófilos respectivamente; Baso y Baso%: recuento y porcentaje de basófilos respectivamente; PLT: recuento plaquetario; MPV: volumen medio plaquetario; PDW: distribución plaquetaria; PCT: plaquetocrito.

5.6. Linealidad o rango analítico de LaserCyte para muestras de asnos.

Los resultados obtenidos en este estudio para los diferentes parámetros se reflejan en Tabla 19 y Tabla 20, así como en las Figura 10. En el caso de los contajes de eosinófilos y basófilos el equipo no devolvió resultado a partir de la tercera dilución (dilución 1/8),

sucedendo igualmente en la dilución 1/16 para los parámetros plaquetarios y en la 1/32 para los analitos de glóbulos rojos.

Los estudios de linealidad o del rango analítico se han llevado a cabo siguiendo las indicaciones previamente publicadas (Wenger-Riggenbach *et al.*, 2006). En este trabajo, LaserCyte demostró una elevada linealidad, con todos los parámetros (salvo en el caso de los monocitos, eosinófilos y basófilos) con coeficientes de correlación sobre 0,9. En nuestro trabajo la mayoría de parámetros también mostró una elevada linealidad y, justamente los que ya en pequeños animales presentaron menos linealidad, fueron los que en asnos también lo hicieron. No obstante, en nuestro trabajo destaca la escasa linealidad observada para la hemoglobina. La hemoglobina suele presentar elevada linealidad, tanto en LaserCyte (Wenger-Riggenbach *et al.*, 2006), como en otros analizadores de veterinaria (Becker *et al.*, 2008). Esta baja linealidad de la hemoglobina en asnos con LaserCyte podría deberse a un hallazgo especie-específico o bien a un fallo concreto del analizador testado en esta tesis.

Tabla 19. Líneas de regresión obtenidas para diferentes parámetros hemáticos de asnos analizadas por sistema LaserCyte.

Parámetros hematológicos	Coefficiente de correlación r	Intercepción a	Pendiente b	Rango Testado
Hematocrito	0,9	0,6	1,1	51,2 - 1,6
Recuento eritrocitario	0,9	0,3	0,9	9,9 - 0,3
Hemoglobina	0,6	3,4	0,8	20,8 - 0,6
Leucocitos	0,9	1,1	0,9	9,8 - 1,1
Linfocitos	0,9	0,7	0,9	3,9 - 0,6
Monocitos	0,6	0,1	1,6	0,6 - 0,1
Neutrófilos	0,9	0,3	0,8	4,9 - 0,3
Eosinófilos	0,7	-0,02	2,1	0,4 - 0,0
Basófilos	0,02	0,0	1,2	0,01 - 0,0
Recuento Plaquetario	0,9	-3,7	1,5	101,0 - 3,2

Tabla 20. Linealidad o rango analítico de LaserCyte para muestras sanguíneas de asno.

Muestra	0	1	Ve	Var	2	Ve	Var	3	Ve	Var	4	Ve	Vari	5	Ve	Var
Dilución	1	1/2			1/4			1/8			1/16			1/32		
HCT (%)	51,2	28,3	25,6	2,7	13,1	12,8	0,3	10,1	6,4	3,7	5,0	3,2	1,8	-	1,6	-
RBC (x10 ⁶ /μL)	9,9	4,9	5,0	-0,1	2,7	24,9	0,2	1,8	12,5	0,6	1,2	0,6	0,6	-	0,3	-
Hb (g/dL)	20,8	11,0	10,4	0,6	8,6	5,2	3,4	8,1	2,6	5,5	6,1	1,3	4,8	-	0,6	-
MCV (fl)	51,4	58,0	51,4	6,6	49,2	51,4	-2,2	56,2	51,4	4,8	42,8	51,4	-8,6	-	51,4	-
MCH (pg)	40,6	38,8	40,6	-1,8	65,6	40,6	25,0	80,1	40,6	39,5	122,0	40,6	81,4	-	40,6	-
MCHC (g/dL)	20,8	22,5	20,8	1,7	32,0	20,8	11,2	44,7	20,8	23,9	51,2	20,8	30,4	-	20,8	-
RDW (%)	12,1	15,8	12,1	3,7	26,1	12,1	14,0	28,1	12,1	16,0	11,2	12,1	-0,9	-	12,1	-
WBC (x10 ³ /μL)	9,8	5,9	4,9	1,1	3,4	2,5	0,9	2,6	1,2	1,4	2,0	0,6	1,4	1,1	0,3	0,8
Lym (x10 ³ /μL)	3,9	2,7	1,9	0,8	1,4	1,0	0,4	1,3	0,5	0,8	1,2	0,2	0,9	0,6	0,1	0,8
Mono (x10 ³ /μL)	0,6	0,6	0,3	0,3	0,6	0,2	0,4	0,1	0,1	0,0	0,3	0,04	0,3	0,1	0,02	0,1
Neu (x10 ³ /μL)	4,9	2,3	2,5	-0,1	1,1	1,2	-0,1	1,1	0,6	0,4	0,4	0,3	0,1	0,3	0,1	0,2
Eos (x10 ³ /μL)	0,4	0,3	0,2	0,1	0,3	0,1	0,2	0,0	0,05	-0,05	0,0	0,03	-0,03	0,0	0,01	-0,01
Baso (x10 ³ /μL)	0,01	0,0	0,0	0,0	0,03	0,0	0,03	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Lym% (%)	39,2	45,2	39,2	6,0	40,1	39,2	0,9	49,6	39,2	10,4	59,6	39,2	20,4	55,2	39,2	16,0
Mono% (%)	6,6	10,1	6,6	3,5	16,6	6,6	10,0	3,2	6,6	-3,4	16,9	6,6	10,3	8,1	6,6	1,5
Neu% (%)	50,0	39,1	50,0	-10,9	32,6	50,0	-17,4	40,2	50,0	-9,8	22,1	50,0	-27,9	30,6	50,0	-19,4
Eos% (%)	4,1	5,6	4,1	1,5	9,8	4,1	5,7	0,0	4,1	-4,1	0,0	4,1	-4,1	0,0	4,1	-4,1
Baso% (%)	0,1	0,0	0,1	-0,1	0,9	0,1	0,8	0,0	0,1	-0,1	0,0	0,1	-0,1	0,0	0,1	-0,1
PLT (x10 ³ /μL)	101,0	69,0	50,5	18,5	36,0	25,2	10,7	20,0	12,6	7,4	-	6,3	-	-	3,2	-
MPV (fl)	4,1	6,1	4,1	2,0	10,0	4,1	5,9	8,4	4,1	4,3	-	4,1	-	-	4,1	-
PDW (%)	19,2	21,1	19,2	1,9	8,9	19,2	-10,3	6,1	19,2	-13,1	-	19,2	-	-	19,2	-
PCT (%)	0,04	0,1	0,02	0,1	0,0	0,01	-0,01	0,01	0,01	0,01	-	0,0	-	-	0,0	-

Ve.- Valor esperable. Var.- Variación. HCT: hematocrito; RBC: células rojas; Hb: hemoglobina; MCV: Volumen corpuscular medio; MCH: Hemoglobina corpuscular media; MCHC: Concentración de hemoglobina corpuscular media; RDW: distribución células rojas; WBC: Leucocitos; Lym y Lym%: recuento y porcentaje de linfocitos respectivamente; Mono y Mono%: recuento y porcentaje de monocitos respectivamente; Neu y Neu%: recuento y porcentaje de neutrófilos respectivamente; Eos y Eos%: recuento y porcentaje de eosinófilos respectivamente; Baso y Baso%: recuento y porcentaje de basófilos respectivamente; PLT: recuento plaquetario; MPV: volumen medio plaquetario; PDW: distribución plaquetaria; PCT: plaquetocrito.

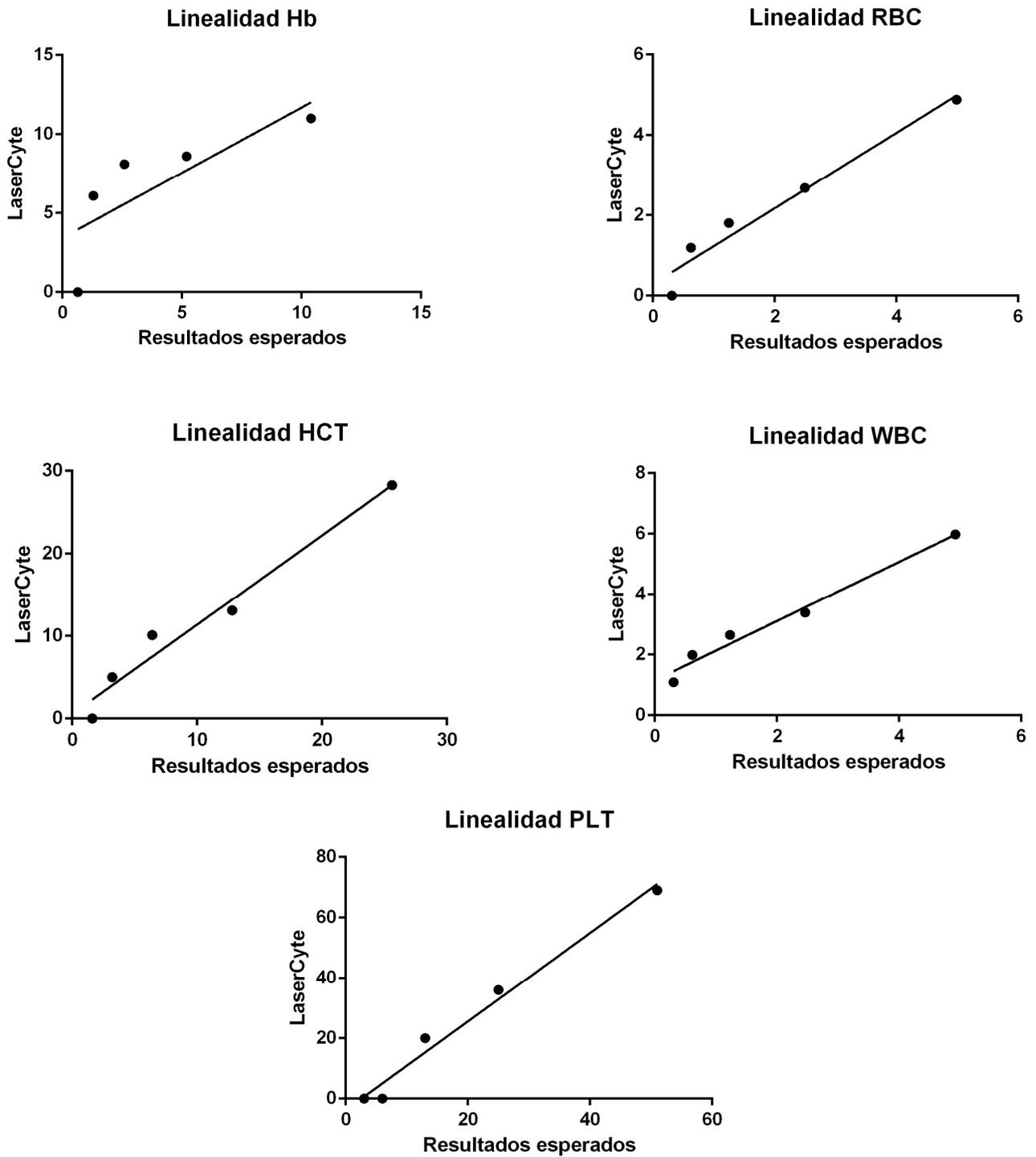


Figura 10. Líneas de regresión obtenidas para diferentes parámetros hemáticos de asnos analizadas por sistema LaserCyte.

5.7. Estudio de background o límite de blanco de LaserCyte para muestras de asnos.

Siguiendo la definición aportada en el apartado de material y métodos, el límite de blanco o *background* de cada parámetro se estableció como el valor mínimo devuelto por el equipo. En el caso de los basófilos se optó por considerar como límite de blanco el valor más bajo obtenido de entre todas las diluciones realizadas. Los resultados de esta parte del estudio quedan recogidos en Tabla 21.

Tabla 21. *Valores de Background para los diferentes parámetros hematológicos de asnos obtenidos para el sistema LaserCyte.*

Parámetros hematológicos	Valor
HCT (%)	5,00
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	1,19
Hb (g/dL)	6,10
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,38
Linfocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,11
Monocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,03
Neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,14
Eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,05
Basófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,01
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	20,00

HCT: hematocrito; RBC: células rojas; Hb: hemoglobina; WBC: Leucocitos; PLT: recuento plaquetario.

Los requerimientos para el *background* de analizadores automáticos únicamente se han publicado para medicina humana (Vis y Huisman, 2016). Si comparamos dichos requerimientos podemos comprobar como LaserCyte en asnos no los cumple (como ejemplo, se exige un *background* inferior a 10.000 eritrocitos por microlitro). No obstante, dado que no existen descripciones de este parámetro previas en medicina veterinaria, el interés de estas mediciones consistiría en conocer, para cada parámetro, el posible tamaño del dato mínimo recuperable, así como una aproximación moderada al nivel de error en términos absolutos en algunos parámetros (si bien el mismo se puede conocer mucho más certeramente consultando los resultados de la exactitud, precisión y error total calculado de LaserCyte).

5.8. Estudio del efecto Carry-Over con LaserCyte en muestras de asnos.

Los resultados obtenidos para RBC, WBC y PTL se reflejan en Tabla 22. Se utilizó la dilución 3 como valor bajo para evitar problemas en los cálculos relacionados con las plaquetas.

Los resultados obtenidos en este estudio de carry-over estuvieron muy cerca de las especificaciones para equipos de medicina humana (Vis y Huisman, 2016), lo cual muestra un elevado rendimiento de LaserCyte en muestras asnales respecto a este tipo de error. Este hallazgo haría descartable el efecto de este artefacto en la inexactitud e imprecisión observada en el equipo. Becker y colaboradores, en 2008, ya demostraron que el efecto de este error es mínimo en distintos analizadores hematológicos en pequeños animales, coincidiendo con nuestros hallazgos. La misma conclusión fue alcanzada por otro estudio más centrado en caballos (Bauer *et al.*, 2011).

Tabla 22. Valores de Carry-Over para los diferentes parámetros hematológicos de asnos obtenidos para el sistema LaserCyte.

Parámetros hematológicos	Carry Over (%)	Vis y Huisman, 2016
RBC	0,66	< 0,5%
WBC	0,25	< 0,2%
PTL	0,79	<0,5%

RBC: células rojas; WBC: Leucocitos; PLT: recuento plaquetario

5.9 Estudio de las alertas de Lasercyte en muestras de asnos.

En un total de 6 animales, el equipo LaserCyte fue incapaz de calcular la MCHC y se obtuvo una alarma con el indicativo VRL. En dichos animales la MCHC fue calculada siguiendo la fórmula de Wintrobe. Todos estos animales mostraron dicho valor elevado de MCHC debido al bajo hematocrito, pudiendo por tanto descartarse la presencia de un fallo en el cálculo de la hemoglobina o una hemólisis muy marcada (Weiser, 2012). Las alertas más comunes obtenidas en el estudio con LaserCyte fueron las siguientes:

- VRL: valor elevado en el conteo de basófilos. El 83 % (70/84 de las muestras). Al comparar los porcentajes reales (obtenidos por diferencial manual) en los animales con esta alerta con las referencias de basófilos previamente publicadas en asnos (Turnbull *et al.*, 2002; Mori *et al.*, 2004; Pitel *et al.*, 2006; Courouce-Malblanc *et al.*, 2008) se concluyó que todos ellos presentaban un

porcentaje y concentración basofílica dentro de los rangos normales para asnos. Por tanto, el 100 % de estas alertas fueron falsos positivos. La aparición de este mensaje podría explicarse por las diferencias entre asnos y caballos, ya que el rango que presenta el *software* interno de LaserCyte para este parámetro es más bajos que el que este estudio ha encontrado en asnos sanos (ver Tabla 23).

- VRL: valor bajo de RBC. El 82,1 % de las muestras (69/84). Únicamente 4 animales de entre los marcados con esta alerta presentaron un RBC bajo rangos previamente publicados (Laus *et al.*, 2015; Burden *et al.*, 2016). Por tanto, 65 de estas alertas fueron falsos positivos y sólo 4 fueron verdaderos positivos. De nuevo, estas alertas estarían justificadas por la presencia en asnos sanos de un RBC más bajo que el presente en caballo, por lo que el uso del *software* de caballos de LaserCyte da lugar al marcaje de estas muestras sin que se correspondan con animales patológicos (ver Tabla 23).

- VRL: valor bajo de HCT. De este número 6 fueron verdaderos positivos y 33 (39/84) falsos positivos. En estos últimos, al igual que sucedía con el RBC, el motivo sería la existencia de diferencias especie-específicas y el uso del *software* de caballos de LaserCyte.

- VRL: valor bajo de Hb. Atendiendo a los rangos publicados en asnos -así como a los resultados obtenidos con el equipo de impedancia-, los 28 asnos marcados se correspondían con falsos positivos. De nuevo, la causa más probable sería el uso de rangos no especie-específicos (ver Tabla 23).

- VRL: valor elevado de MCH. 45/84 de las muestras. Justificable por el uso de rangos no especie-específicos (todos falsos positivos).

- VRL: valor elevado de MCV. Lo presentaron (37/84) de las muestras. Igual al MCH.

- WD: error en la determinación de leucocitos. Las 22 muestras (22/84) presentaron la alerta DB ½, (ver siguiente DB ½).

- DB ½: error en el algoritmo de diferenciación de leucocitos. Llamativamente, todas las muestras con alerta por fallo en el diferencial mostraron este error. DB ½ es una alerta de LaserCyte que indica de forma específica que la morfología celular de la muestra ha hecho difícil diferenciar entre los linfocitos y monocitos, por lo que los contajes y porcentajes de dichas subpoblaciones aparecen en el resultado marcados con un asterisco. En los 22/84 animales marcados los

porcentajes (manuales) de ambas poblaciones entraron dentro de los rangos referenciados previamente para asnos (Turnbull *et al.*, 2012; Laus *et al.*, 2015; Burden *et al.*, 2016), por lo que los mismos se corresponderían con falsos positivos. La causa más probable de esta alerta en última instancia sería el distinto tamaño de los monocitos y linfocitos asnales, tema que se desarrollará en un epígrafe posterior.

- VRL: valor elevado de RDW. Lo presentaron 14/84 animales. Véase Tabla 23 (alerta más probablemente relacionada con distintos rangos según la especie).

- VRL: valor alto de PLT. Lo mostraron 10/84 animales. En estas muestras no se detectó elevación en las plaquetas mediante el sistema de impedancia, por lo que (en principio) todas podrían considerarse falsas positivas. Además, los datos entraban dentro de los rangos previamente reportados para asnos (estando fuera de los rangos de caballo de LaserCyte por valores mínimos).

- VRL: valor bajo de PLT. Estas 4/84 muestras sí que mostraban datos de plaquetas fuera de rangos previos para asnos (Zinkl *et al.*, 1990; Turnbull *et al.*, 2012; Laus *et al.*, 2015; Burden *et al.*, 2016). Al realizar un examen del frotis sanguíneo, en las mismas se observaron agregados plaquetarios, que podrían explicar este hallazgo.

En última instancia, si evaluamos de forma global las alertas de LaserCyte, las mismas aparentemente se debieron a que las muestras eran asnales (y no procedentes de caballo, tal y como creía el propio equipo). Por tanto, la presencia de falsos positivos quedaría explicada por este factor y no por un fallo inherente al equipo. Sin embargo, la escasa fiabilidad de las alertas en los analizadores automáticos ha sido ya previamente reportada (Becker *et al.*, 2008), estando en todas las ocasiones más que justificada la realización de un examen profundo del frotis sanguíneo para comprobar la existencia de la alteración indicada por el equipo. En este estudio de Becker y colaboradores, utilizando Advia 120, se encontraron un total de 33 % de muestras con alerta (intraespecíficas, en pequeños animales) En otro estudio con caballos (Stirn *et al.*, 2014), hasta el 20 % de las muestras de equinos requirieron la realización de un frotis manual para comprobar el conteo diferencial de este equipo. Este porcentaje contrasta con el hallado en nuestro estudio (el 92 % de las muestras mostraron algún tipo de alerta), lo cual quedaría justificado (como ya se ha explicado) por la inexistencia de un *software* y algoritmo diferencial específico para asnos en este equipo.

Parámetro	Intervalo de referencia (asnos)	Intervalos software (caballos)
HCT (%)	22,2 - 42,9	32 - 53
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	4,2 - 7,4	6,8 - 12,9
Hb (g/dL)	9,4 - 14,5	11 - 19
MCV (fl)	36,1 - 67,1	37 - 58
MCH (pg)	16,3 - 24,9	12,3 - 19,9
MCHC (g/dL)	26,2 - 38,2	31 - 38,6
RDW (%)	16,9 - 27,4	17 - 21
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	4,9 - 17,8	5,4 - 14,3
Lym ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1,9 - 8,9	1,5 - 7,7
Mono ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,3 - 1,9	0,1 - 1,0
Neu ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,7 - 7,5	2,3 - 8,5
Eos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,01 - 1,2	0,1 - 1,0
Baso ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,01 - 0,1	0,0 - 0,03
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	53,7 - 354,1	90 - 350

5.10 Efecto de distintas alteraciones morfológicas a nivel del frotis sanguíneo sobre los resultados de LaserCyte en muestras asnales.

Los resultados de LaserCyte se compararon entre animales con anomalías presentes y aquellos que no las presentaban. En Tabla 24 se recogen estos resultados. Las diferencias observadas fueron las siguientes:

- Aquellos animales con policromasia o anisocitosis mostraron valores inferiores de MCHC que los burros sin estos hallazgos. Tal y como se ha comentado en la revisión bibliográfica, una disminución del MCHC puede estar relacionada con dos cuadros: presencia de eritrocitos microcíticos hipocrómicos (anemia ferropénica) o presencia de poblaciones de policromatófilos (regeneración). Dado que no se observaron en estos animales ningún otro signo de anemia ferropénica (microcitosis, presencia de halos en eritrocitos, etc.), la causa más probable de esta diferencia sería la presencia en los animales con estas alteraciones en el frotis de un número moderado de policromatófilos. Este hallazgo nos permite identificar el valor MCHC como útil para el reconocimiento de un cuadro regenerativo en asnos, una vez se haya descartado la presencia de microcitos.

- Los animales en cuyos frotis sanguíneo se detectaron agregados plaquetarios, mostraron valores inferiores de PLT y PCT, así como una tendencia a datos superiores en PWD. Este hallazgo es lógico, pues indica que la formación de

dichos agregados disminuye el conteo total plaquetario (y plaquetocrito, pues dichos agregados se eliminan del cálculo del mismo), incrementándose la variabilidad en el tamaño plaquetario por la presencia de fragmentos de los mismos que pueden ser reconocidos como plaquetas grandes por el equipo.

- En los animales con linfocitos grandes granulares se observó una tendencia a mayor porcentaje de neutrófilos. Este hallazgo podría estar relacionado con la presencia de algún cuadro subclínico en estos burros, que provocase una activación antigénica y una ligera neutrofilia (aunque fuese dentro de los rangos de normalidad) en estos animales.

- Los asnos con presencia de neutrófilos tóxicos o monocitos reactivos, mostraron mayores niveles de Hb que los burros sin dichos hallazgos. Este hallazgo no parece presentar una explicación lógica y tampoco parece tener una relación biológica coherente, siendo por tanto más probablemente un hallazgo estadístico sin importancia clínica.

- Los burros con neutrófilos tóxicos mostraron un mayor hematocrito que aquellos sin este hallazgo. Esto podría relacionarse con algún cuadro subclínico en dichos animales o bien con un hallazgo estadístico sin relevancia clínica.

- Los burros con agregados plaquetarios también mostraron HCT inferiores. Este hallazgo podría estar relacionado con la formación de agregados eritroplaquetarios, que secuestrarían parte de los eritrocitos, los cuales no serían tenidos en cuenta por el analizador para el cálculo del HCT (aunque sí para PCV).

- La presencia de corpúsculos de Howell-Jolly no se relacionaron con ningún cambio a nivel del análisis hematológico con LaserCyte.

Tabla 24. Comparativa de resultados con LaserCyte entre muestras con/sin alteraciones morfológicas a nivel del frotis.

Anomalías morfológicas	Categoría	HCT (%)	RBC (x10 ⁶ /μL)	MCV (fL)	Hb (g/dL)	MCHC (g/dL)	WBC (x10 ³ /μL)	Neu% (%)	PLT (x10 ³ /μL)	PDW (%)	PCT (%)
Agregados plaquetarios	Ausencia	33,7 ± 4,9	5,9 ± 0,8	57,2 ± 6,9	11,8 ± 1,3	34,9 ± 2,4	10,4 ± 3,6	42,1 ± 13,3	236,3 ± 83,1	20,0 ± 1,4	0,16 ± 0,05
	Presencia	31,1 ± 6,4 ^a	5,7 ± 1,1	55,0 ± 9,9	11,4 ± 1,1	34,9 ± 3,1	9,8 ± 2,6	40,5 ± 14,8	178,6 ± 89,5 ^a	20,8 ± 1,6 ^a	0,12 ± 0,06 ^a
Policromasia	Ausencia	33,2 ± 5,7	5,9 ± 0,9	56,4 ± 8,3	11,7 ± 1,3	36,1 ± 2,7	10,4 ± 3,5	42,3 ± 13,7	216,4 ± 91,4	20,4 ± 1,6	0,14 ± 0,06
	Presencia	31,7 ± 3,9	5,6 ± 0,7	57,1 ± 5,5	11,4 ± 1,2	34,6 ± 1,6 ^a	9,6 ± 2,4	38,3 ± 13,9	228,8 ± 76,6	19,7 ± 0,6	0,15 ± 0,05
Anisocitosis	Ausencia	33,2 ± 5,7	6,1 ± 0,9	55,5 ± 8,3	11,7 ± 1,2	35,4 ± 2,4	10,5 ± 3,3	42,9 ± 11,9	229,1 ± 93,3	20,1 ± 1,6	0,15 ± 0,06
	Presencia	32,7 ± 5,4	5,7 ± 1,0	57,2 ± 7,6	11,7 ± 1,3	34,3 ± 2,6 ^a	10,1 ± 3,3	40,7 ± 14,9	211,6 ± 85,7	20,4 ± 1,5	0,14 ± 0,06
Howell-Jolly	0 H-J/10hpf	32,9 ± 5,2	5,9 ± 0,9	56,2 ± 6,9	11,6 ± 1,1	34,6 ± 2,3	11,2 ± 3,5 ^b	40,6 ± 12,1	221,8 ± 76,7	20,4 ± 1,5	0,15 ± 0,05
	1 H-J/10hpf	33,9 ± 6,2	5,9 ± 0,6	58,1 ± 9,6	12,1 ± 1,2	34,8 ± 3,3	8,5 ± 2,5	43,5 ± 17,1	219,2 ± 102,8	20,1 ± 1,8	0,15 ± 0,07
	2 H-J/10hpf	30,4 ± 5,1	5,4 ± 1,1	57,2 ± 7,1	10,9 ± 1,5	34,9 ± 2,1	11,3 ± 3,6	46,1 ± 10,5	249,4 ± 92,5	20,2 ± 1,3	0,16 ± 0,07
	3 H-J/10hpf	33,5 ± 4,9	6,5 ± 1,5	53,1 ± 9,1	12,3 ± 1,5	36,8 ± 1,4	8,9 ± 1,4	34,5 ± 14,8	154,5 ± 84,7	19,9 ± 1,1	0,10 ± 0,05
	≥4 H-J/10hpf	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Neutrófilos tóxicos	Ausencia	32,5 ± 5,5	5,8 ± 0,9	56,5 ± 7,8	11,5 ± 1,2	34,8 ± 2,7	10,3 ± 3,3	40,5 ± 13,5	222,8 ± 86,6	20,1 ± 1,3	0,14 ± 0,06
	Presencia	36,4 ± 4,4 ^a	6,5 ± 1,4	57,1 ± 9,1	13,2 ± 1,0 ^a	35,7 ± 1,5	9,7 ± 2,9	50,4 ± 12,7	185,6 ± 103,6	21,1 ± 2,5	0,14 ± 0,08
Monocitos reactivos	Ausencia	31,7 ± 3,9	5,7 ± 0,9	56,5 ± 6,2	11,3 ± 1,2	35,1 ± 1,8	9,8 ± 2,9	43,7 ± 13,8	228,9 ± 86,8	20,1 ± 1,5	0,15 ± 0,06
	Presencia	33,7 ± 6,2	6,1 ± 0,9	56,6 ± 8,9	11,9 ± 1,2 ^a	34,8 ± 3,1	10,5 ± 3,5	40,3 ± 13,7	212,1 ± 90,1	20,4 ± 1,5	0,15 ± 0,06
LGL	Ausencia	32,3 ± 5,2	5,8 ± 0,9	56,2 ± 8,9	11,6 ± 1,2	35,1 ± 2,5	9,6 ± 2,9	39,7 ± 13,8	204,9 ± 86,9	20,4 ± 1,5	0,14 ± 0,06
	Presencia	34,1 ± 5,9	5,9 ± 0,9	57,2 ± 5,8	11,8 ± 1,4	34,7 ± 2,6	11,4 ± 3,8	45,2 ± 13,0 ^a	243,4 ± 87,9	20,1 ± 1,6	0,16 ± 0,06

HCT: hematocrito; RBC: células rojas; Hb: hemoglobina; MCV: volumen corpuscular medio; MCHC: concentración de hemoglobina corpuscular media; WBC: leucocitos; Neu %: porcentaje de neutrófilos; PLT: recuento plaquetario; PDW: distribución del volumen plaquetario; PCT: plaquetocrito. ^aP<0,05 versus ausencia; ^bP<0,01 versus 1 H-J/10hpf.

6. Estudio morfológico de leucocitos asnales.

Los resultados del estudio morfológico se representan en Tabla 25.

Tabla 25. Resultados del estudio morfológico sobre microfotografías de células sanguíneas de asnos sanos (n=4).

Célula	n	Media (µm)	DE (µm)	Mediana (µm)	Rango percentil 90 (µm)	Relación con tamaño eritrocitario
Eritrocito	500	6,1	0,7	6,1	4,9 - 7,2	1
Neutrófilo	2320	11,8	1,6	11,9	9,02 - 14,4	1,9
Monocito	1509	12,0	2,1	11,8	9,0 - 15,6	2,0
Linfocito	1892	7,8	1,2	7,7	5,8 - 9,9	1,3
Eosinófilo	485	14,6	1,9	14,6	11,6 - 17,8	2,4
Basófilo	92	15,2	1,5	15,2	13,0 - 17,7	2,5

En nuestro estudio morfológico se observan varias variaciones con los datos establecidos para equinos, así como con los previamente aportados para burros (Nayeri, 1978). En este último caso, habría de tenerse en cuenta las diferencias metodológicas entre ambos trabajos, que podrían en gran parte explicar dichas variaciones. En nuestro trabajo el número de células determinadas ha sido mucho más amplio que el utilizado por Nayeri, además de estar basado en un método más exacto, objetivo y evaluable. Dado que todos los animales utilizados para nuestro estudio fueron hembras, no se realizó un estudio del efecto del sexo sobre esta variable y únicamente se compararán los datos con los aportados por Nayeri para hembras.

Antes de proceder a la discusión de estos datos, cabría recordar sucintamente los errores sistemáticos (inexactitud) observados en ambos analizadores al compararse con el conteo diferencial (*gold standard*):

- LaserCyte sobrestimó los linfocitos (+7,7 %), monocitos (+0,9 %) y basófilos (+0,3 %), subestimando neutrófilos (-8,7 %) y eosinófilos (-0,4 %).
- Sysmex F820 sobrestimó los linfocitos (+12,2 %) y subestimó monocitos y granulocitos (-11,3 %).

De nuestros datos de morfometría podríamos destacar los siguientes puntos:

- Los eritrocitos mostraron un diámetro medio inferior al previamente obtenido por Nayeri en 1978 (6,3 μm en hembras). El valor obtenido sí que se hallaba en el rango establecido para asnos por Lloyd y Johnson (1924), si bien en este trabajo no se distinguió específicamente los eritrocitos asnales de los de otras especies. El diámetro medio de los glóbulos rojos de asno fue marcadamente superior al reportado para caballos con una técnica similar (5,1 - 5,8 μm -Adili y Melizi, 2014-). Este mayor diámetro eritroide en asnos respecto a caballos estaría relacionado con el mayor volumen (MCV) del eritrocito asnal y, por ende, con el menor número de glóbulos rojos circulantes normalmente detectado en esta especie (Hawkey *et al.*, 1991; Katyukhin *et al.*, 1998). Estas variaciones en el MCV y RBC respecto a los rangos de caballos también se hallaron en nuestro trabajo, independientemente de la técnica utilizada. Si se observa el rango obtenido mediante morfometría (calculado como el intervalo al 90 % entre los percentiles 5 y 95 %), se puede comprobar que en asnos puede aparecer de forma fisiológica una ligera anisocitosis (con eritrocitos que casi doblan el tamaño de otros). No obstante, dado que estos datos proceden de 4 animales diferentes y las células se sometieron a centrifugación y extensión, este hallazgo podría estar más relacionado con variaciones en la extensión eritrocitaria. En última instancia, viendo estos datos, hemos de considerar que la falta de sincronía entre los tamaños reportados para eritrocitos en caballos y el tamaño del glóbulo rojo asnal podría ser fuente de errores en la determinación de LaserCyte. Así, podríamos hipotetizar que algún eritrocito asnal podría no haberse considerado como tal por el equipo (más aún si la lisis no fue correcta).

- Los neutrófilos mostraron un tamaño medio dentro del rango reportado para caballos (10-15 μm según Grondin y DeWitt, 2010). El tamaño medio fue marcadamente inferior al reportado por Nayeri (12,9 μm), si bien la relación con el tamaño eritrocitario de este trabajo (2,0) sí es más cercana a nuestro estudio. El rango de tamaños neutrofílicos fue muy amplio, apareciendo solapamiento (y, por tanto, posibilidades de confusión) tanto con otras poblaciones de granulocitos (eosinófilos y basófilos) como con los linfocitos y, sobre todo (solapamiento muy amplio), con los monocitos. Este último problema de confusión entre neutrófilos y

otras subpoblaciones ha sido ya descrito para LaserCyte (Papasouliotis *et al.*, 2006). El solapamiento entre el rango de tamaño neutrofilico asnal (9 - 14 μm) y el reportado para los linfocitos de caballo (7 - 12 μm) fue también muy amplio.

- Este amplio solapamiento podría explicar por qué los algoritmos de clasificación leucocitaria de los analizadores pueden mostrar dificultades a la hora de reconocer a estas células en asnos, tal y como se ha observado en estudios previos (Lebien, 2006). Los sistemas de impedancia basan el reconocimiento leucocitaria mayormente en el tamaño celular, por lo que la subestimación de granulocitos que apareció con Sysmex F820 podría fácilmente deberse a la inclusión de los mismos como linfocitos.

- En LaserCyte, hemos de recordar que el reconocimiento leucocitario se basa tanto en el tamaño celular como en el estudio de la complejidad (granularidad) citoplasmática. Por ello, para que la mala clasificación neutrofílica afectase a LaserCyte, además de un tamaño relativamente bajo, sería necesario que se hubiera producido en dichos neutrófilos una degranulación citoplasmática marcada o que la granularidad de estas células asnales no hubiera sido adecuadamente reconocida por el equipo.

- Los linfocitos asnales mostraron en este estudio un tamaño medio en el rango, pero en valores muy inferiores, reportado para caballos (7 - 12 μm , según Latimer y Rackich, 1992). El tamaño obtenido fue marcadamente inferior al previamente reportado por Nayeri (9,2 μm), lo cual podría deberse a variaciones metodológicas. El rango obtenido para los linfocitos mostró un amplio solapamiento tanto con los monocitos y neutrófilos.

Dado que tanto monocitos como linfocitos son células agranulares y su clasificación depende del tamaño (tanto en equipos de impedancia como en equipos láser), este hallazgo indica que en burros un alto porcentaje de linfocitos pueden ser mal clasificados por los analizadores como monocitos y al contrario.

Respecto al solapamiento linfocitos-neutrófilos, tal y como se ha comentado, la degranulación *ex vivo* podría también explicar intercambios en las identificaciones entre ambas poblaciones. En última instancia, y con los resultados

de inexactitud en ambos equipos (ambos analizadores sobrestimaron sobremanera los linfocitos), la hipótesis más probable es que gran número de neutrófilos (e incluso eosinófilos) de asnos no sean reconocidos como tales por los equipos y se clasifiquen como linfocitos o monocitos.

- Los monocitos asnales mostraron en este trabajo un tamaño medio solo ligeramente superior al neutrofílico. Llamativamente, estas células no fueron las de mayor tamaño a nivel del frotis sanguíneo, al contrario de lo que se suele sugerir comúnmente y se da por hecho en caballos (Grondin y Dewitt, 2010). El diámetro medio obtenido fue marcadamente superior al reportado por Nayeri en 1978 (10,2 μm), si bien este autor únicamente midió 40 células para obtener este dato. Al igual que sucediera con los neutrófilos, se observó un marcado solapamiento con prácticamente todas las subpoblaciones leucocitarias restantes. Llamativamente, este solapamiento solo conllevó un ligero incremento porcentual en los monocitos, probablemente por clasificar como tales ciertos neutrófilos y/o eosinófilos, tal y como se ha comentado anteriormente. La ausencia de grandes variaciones en el tamaño leucocitario entre subpoblaciones asnales también sería un factor muy a tener en cuenta para comprender la dificultad a la hora de realizar la diferenciación por parte de los equipos (más aún cuando ambos partían con algoritmos específicos para caballos, no para burros).

- Respecto a los eosinófilos, el tamaño fue muy similar al reportado por Nayeri en hembras (14,4 μm). Se observó un amplio solapamiento de esta subpoblación con monocitos, neutrófilos y basófilos que, junto con el común hallazgo de degranulación (observada en este caso incluso a nivel de frotis sanguíneo) en eosinófilos asnales, podría explicar en gran medida la inexactitud encontrada en ambos equipos.

- Por último, los basófilos fueron sistemáticamente las células de mayor tamaño observadas en este estudio morfométrico. Este hallazgo es marcadamente distinto a estudios previos en burros, donde los basófilos fueron incluso más pequeños que los eosinófilos (13 μm , Nayeri, 1978). Sin embargo, cabría recordar que en el trabajo de Nayeri únicamente se midieron 10 basófilos. Aunque en nuestro

trabajo se midieron muchas más células, la importancia de esta subpoblación a la hora de explicar fallos en los contajes de otros leucocitos debería ser muy relativa debido a su rara aparición.

En Figura 11 se recoge un resumen de los datos ya expuestos obtenidos mediante morfometría, en forma de histograma (cada curva se forma atendiendo al tamaño en micras medido y el número de células con dicho tamaño, por lo que se puede evaluar fácilmente rango de tamaños y distribución de los datos). En la misma se puede observar, mucho más gráficamente, la amplia zona de solapamiento entre neutrófilos-monocitos-linfocitos en la zona de las 10 μm , que podría relacionarse con la inexactitud encontrada para ambos analizadores. También se puede observar como el tamaño neutrofilico y monocítico es prácticamente el mismo en la población estudiada.

Los resultados obtenidos a nivel morfométrico de nuevo subrayan la importancia de implementar algoritmos diferenciales leucocitarios específicos para asnos en los analizadores automáticos.

Histograma del tamaño leucocitario en asnos

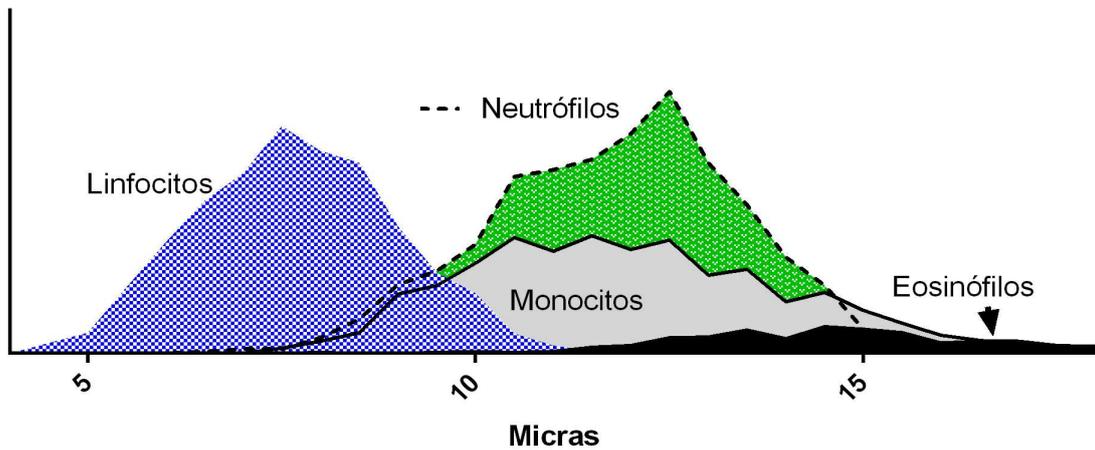


Figura 11. Histograma del tamaño de las poblaciones leucocitarias en asnos. Los basófilos se han omitido para mejor visualización.

IX. CONCLUSIONS

1. Hematological variables from Andalusian donkeys are significantly different to referenced ranges from horses, but similar to other previous reports in donkeys.

2. Younger (<6 years old) donkeys show higher hematocrits, red and white blood cell counts, as well as hemoglobin concentrations compared to older donkeys. Male donkeys tend to present higher red blood cell counts and lower mean corpuscular cell volume and hemoglobin.

3. LaserCyte shows high accuracy and precision for donkey hematocrit, but significant errors are found in the leukocyte differential. While linearity, background and carry-over are appropriate, flags in this analyzer are not sensitive in donkey samples. Sysmex F820 lacks accuracy for every studied analyte in donkeys except for hemoglobin. Agreement between both analyzers and manual techniques is generally poor and their results should not be extrapolated in donkeys. Attending to current requirements and recommendations in veterinary clinical pathology, these analyzers should not be used in donkey samples.

4. Morphometric study shows a wide size overlap between monocytes, lymphocytes and neutrophils in donkey blood, which could explain some misclassifications observed in both analyzers.

5. Donkey-specific algorithms are needed in hematological analyzers in order to correctly evaluate samples from this species. If not available, leukocyte differentials should be performed visually on smears.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aceña MC, García-Belenguer S, Gascón M, Purroy A. Modifications hématologiques et musculaires pendant la corrida chez le taureau de combat. *Rev. Méd. Vét.*, 146(4):277-282, 1995.
- Adili N, Melizi M. Preliminary study of the influence of red blood cells morphometry on the species determinism of domestic animals. *Veterinary World*, 7(4):219-223, 2014.
- Ahmed AE, Abdel-Hamid HY, Abdel-Rahim AA, Ismail MN. The influence of age and sex on some blood parameters in healthy donkey in south Valley Egypt. *BS. Vet. Med. J.*, 5:151-158, 2007.
- Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman I.L. A congenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, 404(6774):193-197, 2000.
- Allen AL, Myers SL, Searcy GP, Fretz PB. Hematology of equine fetuses with comparison to their dams. *Vet. Clin. Pathol.*, 27(3):93-100, 1998.
- Allen BV, Powell DG. Effects of training and time of day of blood sampling on the variation of some common haematological parameters in the normal thoroughbred racehorses. In: *Equine Exercise Physiology*. Snow DH, Persson SGB, Rose RJ (eds), 1983. Granta Editions, Cambridge, UK.
- Allen WR, Kydd J, Boyle MS, Antczak DF. Between-species transfer of horse and donkey embryos: A valuable research tool. *Equine Vet. J.*, 17(53):53-62, 1985.
- Alsaker RD. The formation, emergence, and maturation of the reticulocyte: a review. *Vet. Clin. Pathol.*, 6(3):7-12, 1977.
- Ankringa N, Wijnberg ID, Boerma S, Ijzer J. Copper-associated hepatic cirrhosis in a Friesian horse. *Tijdschr Diergeneeskde*, 137(5):310-314, 2012.
- Aoki T, Ishii H. Hematological and biochemical profiles in peripartum mares and neonatal foals (Heavy Draft horse). *J. Equine Vet. Sci.*, 32(1):170-176, 2012.
- Arai F, Yoshihara H, Hosokawa K, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Suda T. Niche regulation of hematopoietic stem cells in the endosteum. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1176(7):36-46, 2009.
- Aranguren-Mendez J, Jordana J, Gomez M. Genetic conservation of five endangered Spanish donkey breeds. *J. Anim. Breed. Gene.*, 119(4):256-263, 2002.
- Ashley FH, Wareman-Pearson AE, Whay HR. Behavioural assessment of pain in horses and donkeys: application to clinical practice and future studies. *Equine Vet. J.*, 37(6):565-575, 2005.

- Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 27(1):669-692, 2009.
- Bach V, Schruckmayer G, Sam I, Kemmler G, Stauder R. Prevalence and possible causes of anemia in the elderly: a cross-sectional analysis of a large European university hospital cohort. *Clin. Interv. Aging.*, 9(1):1187-1196, 2014.
- Balasundaresan D, Saraboji K, Ponnuswamy MN. Crystal structure of haemoglobin from donkey (*Equus asinus*) at 3Å resolution. *Biochimie.*, 88(6):719-723, 2006.
- Barao I, Ascensao JL. Human natural killer cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 46:213-229, 1998.
- Barger AM. Erythrocyte morphology. In: Schalm's Veterinary Hematology. Weiss DJ, Wardrop KJ (eds), 6th ed, 2010. Wiley-Blackwell. Iowa, USA.
- Battinelli EM, Hartwig JH, Italiano JE, Jr. Delivering new insight into the biology of megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Curr. Opin. Hematol.*, 14(5):419-426, 2007.
- Bauer N, Nakagawa J, Dunker C, Failing K, Moritz A. Evaluation of the automated hematology analyzer Sysmex XT-2000iVTM compared to the ADVIA_ 2120 for its use in dogs, cats, and horses: part I—precision, linearity, and accuracy of complete blood cell count. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 23(6):1168-1180, 2011.
- Bauer N, Nakagawa J, Dunker C, Failing K, Moritz A. Evaluation of the automated hematology analyzer Sysmex XT-2000iV TM compared to the ADVIA _ 2120 for its use in dogs, cats, and horses. Part II: accuracy of leukocyte differential and reticulocyte count, impact of anticoagulant and sample aging. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 24(1):74-89, 2012.
- Bäumler H, Neu B, Mitlöchner R, Georgieva R, Meiselman HJ, Kiesewetter H. Electrophoretic and aggregation behavior of bovine, horse and human red blood cells in plasma and in polymer solutions. *Biorheology*, 38(1):39-51, 2001.
- Bayly WM, Meyers KM, Keck MT, Huston LJ, Grant BD. Exercise-induced alterations in haemostasis in thoroughbreds horses. In: Equine Exercise Physiology. Snow DH, Person SGD, Rose RJ (eds), 1983. Granta Editions, Cambridge, UK.
- Beautyman W, Bills T. Osmotic error in erythrocyte volume determinations. *Am. J. Hematol.*, 12(4):383-389, 1982.
- Becker M, Moritz A, Giger U. Comparative clinical study of canine and feline total blood cell count results with seven in-clinic and two commercial laboratory hematology analyzers. *Vet. Clin. Pathol.*, 37(4):373-384, 2008.

- Bentley SA. Automated differential white cell counts: a critical appraisal. *Bailliere. Clin. Haematol.*, 3(4):851-869, 1990.
- Berlink B, Correa J, Evangelista A, Peixoto R, Penteado C. Constituintes hematimétricos do sangue de éguas gestantes de raça árabe. *Veterinaria Noticias*, 6(1):51-55, 2000.
- Bertrand JY, Jalil A, Klaine M, Jung S, Cumano A, Godin I. Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac. *Blood*, 106(9):3004-3011, 2005.
- Bienzle D, Stanton JB, Embry JM, Bush SE, Mahaffey EA. Evaluation of an in-house centrifugal hematology analyzer for use in veterinary practice. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 217(8):1195-200, 2000.
- Bienzle D. Monocytes and macrophages. In: Schalm's Veterinary Hematology. Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC (eds), 5th ed, 2000. Lippincott Williams & Wilkins. Iowa, USA.
- Biggs R, Macmillan RL. The Error of the Red Cell Count. *J. Clin. Pathol.*, 1(5):288-291, 1948.
- Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*, 1(8476):307-310, 1986.
- BOE 23/2009, RD 2129/2008, 26 de diciembre.
- Bonelli F, Rota A, Corazza M, Serio D, Sgorbini M. Hematological and biochemical findings in pregnant, postfoaling, and lactating jennies. *Theriogenology*, 85(7):1233-1238, 2015.
- Bonnadonna T, Fornaroli D, Succi G. Preliminary Observations on Serum Proteins in the Horse and Donkey and their Interspecific Hybrids. *Transbound. Emerg. Dis.*, 14(9):845-848, 1967.
- Borioni N, Marinaro P, Celestini S, Del Sole F, Magro R, Zoppi D, Mattei F, Dall' Armi V, Mazzarella F, Cesario A, Bonassi S. Effect of equestrian therapy and onotherapy in physical and psycho-social performances of adults with intellectual disability: a preliminary study of evaluation tools based on the ICF classification. *Disabil. Rehabil.*, 34(4):279-287, 2012.
- Bornhorst JA, Roberts RF, Roberts WL. Assay-specific differences in lipemic interference in native and intralipid-supplemented samples. *Clin. Chem.*, 50(11): 2197-2201, 2004.
- Boudreaux MK, Ebbe S. Comparison of platelet number, mean platelet volume and platelet mass in five mammalian species. *Comp. Haematol. Int.*, 8(1):16-20, 1998.
- Boudreaux MK, Humphries DM. Identification of potential platelet alloantigens in the Equidae family by comparison of gene sequences encoding major platelet membrane glycoproteins. *Vet. Clin. Pathol.*, 42(4):437-442, 2013.

- Boudreaux MK. Platelet Structure. In: Schalm's Veterinary Hematology. Weiss DJ, Wardrop KJ (eds), 6th ed, 2010. Wiley-Blackwell. Iowa, USA.
- Boudreaux MK. Thrombopoiesis In: Schalm's Veterinary Hematology. Weiss DJ, Wardrop KJ (eds), 6th ed., 2010. Wiley-Blackwell. Iowa, USA.
- Braun JP, Bourges-Abela N, Gefr e A, Concordet D, Trumel C. The preanalytic phase in veterinary clinical pathology. *Vet. Clin. Pathol.*, 44(1):18-25, 2015.
- Briggs C, Culp N, Davis B, d'Onofrio G, Zini G, Machin SJ. ICSH guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting. *Int. J. Lab. Hematol.*, 36(6):613-627, 2014.
- Briggs C, Culp N, Davis B, Zini G, Machin SJ. ICSH guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting. *Int. J. Lab. Hematol.*, 36(1):613-627, 2014.
- Brockus CW, Anderasen CB. Erythrocytes. In: Duncan and Prasse's Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology. Latimer KS, Mahaffey EA, Prasse KW (eds), 2003. Iowa State Press. Iowa, USA.
- Brown DG, Cross FH. Hematologic values of donkeys from birth to maturity: cellular elements of peripheral blood. *Am. J. Vet. Res.*, 30:1921-1927, 1969.
- Brown SA, Barsanti JA. Quantitative buffy coat analysis for hematologic measurements of canine, feline and equine blood samples and for detection of microfilaremia in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 49(3):321-324, 1988.
- Burden F, Trawford A. Equine interspecies aggression. *Vet. Rec.*, 159(25):859-860, 2006.
- Burden FA, Hazell-Smith E, Mulugeta G, Patrick V, Trawford R, Brooks HW. Reference intervals for biochemical and haematological parameters in mature domestic donkeys (*Equus asinus*) in the UK. *Equine Vet. Educ.*, 28(3):134-139, 2016.
- Burguez PN, Ousey J, Cash RS, Rosedale PD. Changes in blood neutrophil and lymphocyte counts following administration of cortisol to horses and foals. *Equine Vet. J.*, 15(1):58-60, 1983.
- Burkhard MJ. Lymphopoiesis In: Schalm's Veterinary Hematology. Weiss DJ, Wardrop KJ (eds). 6th ed. 2010. Wiley-Blackwell. Iowa, USA.
- Burnham SL. Anatomical differences of the donkey and mule In: *proceedings of the 48th Annual Meeting American Asociation Equine Practitioners*, 2002.

- Caldin M, Furlanello T, Solano-Gallego L, De Lorenzi D, Carli E, Tasca S, Lubas G. Reference ranges for haematology, biochemical profile and electrophoresis in a single herd of Ragusana donkeys from Sicily (Italy). *Comp. Clin. Pathol.*, 14(1):5-12, 2005.
- Campuzano-Maya G. El hemograma electrónico. *Laboratorio Al Día*, 5:28-41, 1995.
- Capomaccio S, Cappelli K, Spinsanti G, Mencarelli M, Muscettola M, Felicetti M, Verini Supplizi A, Bonifazi M. Athletic humans and horses: Comparative analysis of interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor (IL-6R) expression in peripheral blood mononuclear cells in trained and untrained subjects at rest. *BMC Physiol.*, 11:3, 2011.
- Caracostas MC, Moore WE, Smith JE. Intravascular neutrophilic granulocyte kinetics in horses. *Am. J. Vet. Resch.*, 42(4):623-625, 1989.
- Carbonell F, Calvo W, Fliedner TM. Cellular composition of human fetal bone marrow. Histologic study in methacrylate sections. *Acta. Anat. (Basel)*, 113(4):371-375, 1982.
- Cartwright GE. El laboratorio en el diagnóstico hematológico. Barcelona (España), 1973.
- Cebulj-Kadunc N, Bozic M, Kosec M, Cestnik, V. The influence of age and gender on haematological parameters in Lipizzan horses. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.*, 49(4):217-221, 2002.
- Cembrowski GS, Clarke G. Quality control of automated cell counters. *Clin. Lab. Med.*, 35(1):59-71, 2015.
- Cheng Z, McKellar Q, Nolan A, Lees P. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of phenylbutazone and oxyphenbutazone in the donkey. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 19(2):149-151, 1996a.
- Cheng Z, McKellar Q, Nolan A, Lees P. Preliminary pharmacokinetic and pharmacodynamic studies on flunixin meglumine in donkeys. *Vet. Res. Comm.*, 20(5):469-472, 1996b.
- Clark P, Mogg TD, Tvedten HW, Korcal D. Artifacts changes in equine blood following storage, detected using the ADVIA 120 hematology analyzer. *Vet. Clin. Pathol.*, 31(2):90-94, 2002.
- Clinical Laboratory Standards Institute. Procedure for Determining Packed Cell Volume by the Microhematocrit Method: Approved Standard, 3th ed, 2000. CLSI document H07-A3.
- Coakley M, Peck KE, Taylor TS, Matthews NS, Mealey KL. Pharmacokinetics of flunixin meglumine in donkeys, mules and horses. *Am. J. Vet. Res.*, 60(11):1441-1444, 1999.

- Collins SN, Dyson SJ, Murray RC, Burden F, Trawford A. Radiological anatomy of the donkey's foot: objective characterisation of the normal and laminitic donkey foot. *Equine Vet. J.*, 43(4):478-486, 2011.
- Contri A, Gloria A, Robbe D, De Amicis I, Carluccio A. Characteristics of donkey spermatozoa along the length of the epididymis. *Theriogenology*, 77(1):166-173, 2012.
- Cook AM, Moritz A, Freeman KP, Bauer N. Quality requirements for veterinary hematology analyzers in small animals-a survey about veterinary experts' requirements and objective evaluation of analyzer performance based on a meta-analysis of method validation studies: bench top hematology analyzer. *Vet. Clin. Pathol.*, 45(3):466-476, 2016.
- Cooper C, Sears W, Rienze D. Reticulocyte changes after experimental anemia and erythropoietin treatment of orses. *J. Appl. Physiol.*, 99(3):915-921, 2005.
- Cotlove E, Harris E.K, Williams G.Z. Biological and analytical components of variation in longterm studies of serum constituents in normal subjects. III Physiological and medical implications. *Clin. Chem.* 16(12):1028-1032, 1970.
- Cottorello ACP, Amancio RC, Henry M, Borges I. Effect of storage temperature and extenders on "in vitro" activity of donkey spermatozoa. *Theriogenology*, 58(2):325-328, 2002.
- Courouce-Malblanc A FG, Moulin M, Valette JP, Petit L, Dumontier S, Pitel PH. Reference values on hematologic and biochemical parameters in French donkeys. In: *proceeding of the 10th International Congress of World Equine Veterinary Association*, 2008.
- Cramer DV, Lewis RM. Reticulocyte response in the cat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 160(1):61-67, 1972.
- Criel M, Godefroid M, Deckers B, Devos H, Cauwelier B, Emmerechts J. Evaluation of the Red Blood Cell Advanced Software Application on the CellaVision DM96. *Int. J. Lab. Hematol.*, 38(4):366-374, 2016.
- Cubeddu GM, Bini PP, Floris B, Carcangiu V, Bomboi G, Pintori G. Hematologic parameters of the white donkeys of Asinara. *Boll. Soc. Tal. Biol. Sper.*, 67(6):577-584, 1991.
- Da Costa RP, Carvalho H, Agrícola R, Alpoim-Moreira J, Martins C, Ferreira-Dias G. Peripheral blood neutrophil function and lymphocyte subpopulations in cycling mares. *Reprod. Domest. Anim.*, 38(6):464-469, 2003.
- Dabrowski Z, Sano MI, Tabarowski Z, Witkowska-Pelc E, Spadacci MD, Spodaryk K, Podkowa D. Haematopoiesis in snakes (Ophidia) in early postnatal development. *Cell Tissue. Res.*, 328(2):291-299. 2007.

- Davis EG, Wilkerson MJ, Rush BR. Flow Cytometry: Clinical Applications in Equine Medicine. *J. Vet. Intern. Med.*, 16(4):404-410, 2002.
- Day. Biology of Lymphocytes and Plasma Cells In: Schalm's Veterinary Hematology. Weiss DJ, Wardrop KJ (eds), 6th ed, 2010. Wiley-Blackwell. Iowa, USA.
- Delling U, Lindner K, Ribitsch I, Jülke H, Brehm W. Comparison of bone marrow aspiration at the sternum and the tuber coxae in middle-aged horses. *Can. J. Vet. Res.*, 76(1):52-56, 2012.
- DeNicola D. Advances in Hematology Analyzers. *Top. Companion Anim. Med.*, 26(2):52-61, 2011.
- Departamento de Patología Clínica de la Universidad de Cornell, datos publicados online en la página <http://www.eclinpath.com>.
- Deubelbeiss KA, Dancey JT, Harker LA, Finch, CA. Neutrophil kinetics in the dog. *J. Clin. Invest.*, 55(4):833-839, 1975.
- Dewhurst EC, Crawford E, Cue S, Dodkin S, German AJ, Papasouliotis K. Analysis of canine and feline haemograms using the VetScan HMT analyser. *J. Small Anim. Pract.*, 44(10):443-448, 2003.
- Di Martino G, Stefani AL, Lippi G, Gagliazzo L, McCormick W, Gabai G, Bonfanti L. The degree of acceptability of swine blood values at increasing levels of hemolysis evaluated through visual inspection versus automated quantification. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 27(3):306-312, 2015.
- Dinev D, Khubenov KD. Normal values of the hematological, biochemical and enzymological indices of the donkey. *Vet. Med. Nauki*, 23(10):69-75, 1986.
- Dittrich W, Goñde W. Flow-through chamber for photometers to measure and count particles in a dispersion medium. *Patent DE*, 1815352, 1968.
- Du Toit N, Gallagher J, Burden FA, Dixon PM. Post mortem survey of dental disorders in 349 donkeys from an aged population (2005-2006). Part 2: epidemiological studies. *Equine Vet. J.*, 40(3):209-213, 2008.
- Dugat SL, Taylor TS, Matthews NS, Gold JR. Values for Triglycerides, Insulin, Cortisol, and ACTH in a Herd of Normal Donkeys. *J. Equine Vet. Sci.*, 30(3):141-144, 2010.
- Durand C, Dzierzak E. Embryonic beginnings of adult hematopoietic stem cells. *Haematologica*, 90(1):100-108, 2005.

- El Ouriaghli F, Fujiwara H, Melenhorst JJ, Sconocchia G, Hensel N, Barrett AJ. Neutrophil elastase enzymatically antagonizes the in vitro action of G-CSF: implications for the regulation of granulopoiesis. *Blood*, 101(5):1752-1758, 2003.
- El-Maghraby HM, Atta AH. Sedative and analgesic effects of detomidine with and without butorphanol in donkeys. *Assiut. Vet. Med. J.*, 37(1):201-211, 1997.
- Erslev AJ, Beutler E. Production and destruction of erythrocytes. In: Williams Hematology. Beutler E, Lichtman MA, Coller BS (eds), 5th ed, 1995. New York: McGraw-Hill.
- Escudero A, González JR, Benedito JL, Prieto FR, Ayala I. Electrocardiographic parameters in the clinically healthy Zamorano-leones donkey. *Res. Vet. Sci.*, 87(3):458-461, 2009.
- Estridge BH, Reynolds AP, Walters NJ. Basic Medical Laboratory Techniques, 4th ed, 1999. Cengage Learning. Albany, USA.
- Etana KM, Jenbere TS, Bojia E, Negussie H. Determination of reference hematological and serum-biochemical values for working donkeys of Ethiopia. *Vet. Res.*, 4(3):90-94, 2011.
- Fajardo Lobo-Guerrero LF. Procedimientos básicos en hematología. In Técnicas de laboratorio en hematología clínica. Restrepo-Mesa A (eds), 1975. Sociedad Colombiana de Hematología, Editorial de la Universidad de Anioquia; Medellín, Colombia.
- Farr AJ, Freeman KP. Quality control validation, application of sigma metrics, and performance comparison between two biochemistry analyzers in a commercial veterinary laboratory. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 20(5):536-544, 2008.
- Faye O, Azza S, Adil B, Doudou D, Berthé MA, Ndiaye M, Afoutou JM, Touré CT, Anthonioz P. Diagnostic interest of Barr chromatin test in sex determination: about one case of male pseudohermaphroditism. *Dakar Med.*, 52(3):204-208, 2007.
- Feige K, Schwarzwald CC, Bombeli T. Comparison of unfractionated and low molecular weight heparin for prophylaxis of coagulopathies in 52 horses with colic: a randomised double-blind clinical trial. *Equine Vet. J.*, 35(5):506-513, 2003.
- Fernandes PJ, Modiano JF, Wojcieszyn J, Pierce KR. Use of the Cell-Dyn 3500 to predict leukemic cell lineage in peripheral blood of dogs and cats. *Vet. Clin. Pathol.*, 31(4):167-182, 2002.
- Fielder S. Hematologic references values. In The Merck Veterinary Manual. Beers M (eds), 11th ed, 2016. Elsevier. UK.
- Fleming KA, Barton MH, Latimer KS. Iron deficiency anemia in a neonatal foal. *J. Vet. Intern. Med.*, 20(6):1495-1498, 2006.

- Folch P, Jordana J, Cuenca R. Reference ranges and the influence of age and sex on haematological values of the endangered Catalanian donkey. *Vet. J.*, 154(2):163-168, 1997.
- French JM, Patrick VH. Reference values for physiological, haematological and biochemical parameters in domestic donkeys (*Equus asinus*). *Equine Vet. Educ.*, 7(5):33-35, 1995.
- Friend, TH. Dehydration, stress and water consumption of horses during longdistance commercial transport. *J. Anim. Sci.*, 78(10):2568-2580, 2001.
- Galli SJ, Metcalfe DD, Arber DA. Basophils and mast cells and their disorders In: Williams Hematology. Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ (eds), 7th ed, 2006. McGraw-Hill. New York, USA.
- Gascoyne SC, Hawkey CM. Patterns of variation in vertebrate haematology. *Clin. Hemorheol.*, 12(5):627-637, 1992.
- Gaunt SD, Prescott-Mathews JS, King WW, Scholl DT. Clinical hematology practices at veterinary teaching hospitals and private diagnostic laboratories. *Vet. Clin. Pathol.*, 24(2):64-67, 1995.
- Geminard C, de Gassart A, Vidal M. Reticulocyte maturation: mitoptosis and exosome release. *Biocell*, 26(2):205-215, 2002.
- Geor RJ, Lund EM, Weiss DJ. Echinocytosis in horses: 54 cases (1990). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 202(6):976-980, 1993.
- Geor RJ, Weiss DJ, Burris SM, Smith CM. Effects of furosemide and pentoxifylline on blood flow properties in horses. *Am. J. Vet. Res.*, 53(11):2043-2049, 1992.
- George JW, Lane VM, Snipes JN. Changes in bovine hematology references intervals from 1965 to 2001. *Vet. Clin. Pathol.*, 36: 313-312, 2008.
- Gerarde HW. The unopette[®] system in the clinical laboratory. *Microchem. J.*, 9(3):340-351, 1965.
- Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochem. Med. (Zagreb)*, 25(2):141-151, 2015.
- Gill J, Rastawicka M. Diurnal changes in the hematological indices in the blood of racing Arabian horses. *Polskie Archiwum Weterynaryjne*, 26(1):169-179, 1986.
- Gill J, Szwarcoka-Priebe T, Krupska U, Peplowska Z. Seasonal changes in haematological indices, protein and glycoprotein levels and in activity of some enzymes in Arabian horses. *Bulletin of the Academy Polish Science and Biology*, 26(10):719-723, 1979.

- Gill J, Wanska E. Seasonal changes in erythrocyte, hemoglobin and leukocyte indexes in barren mares of thoroughbred horses. *Bulletin of the Academy Polish Science and Biology*, 26(5):347-53, 1978.
- Gimble JM, Robinson CE, Wu X, Kelly KA. The function of adipocytes in the bone marrow stroma: an update. *Bone*, 19(5):421-428, 1996.
- Giordano A, Rossi G, Pieralisi C, Paltrinieri S. Evaluation of equine hemograms using the ADVIA 120 as compared with an impedance counter and manual differential count. *Vet. Clin. Pathol.*, 37(1):21-30, 2008.
- Girardi AM, Marques LC, Toledo CZP, de Campos E. Hematological variables of the Pêga donkey (*Equus asinus*) breed: influence of age and sex. *Comp. Clin. Pathol.*, 24(5):335-342, 2015.
- Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical comparisons of interferences in clinical chemistry instrumentation. *Clin. Chem.*, 32(3): 470-475, 1986.
- Golland LC, Evans DL, McGowan CM, Hodgson DR, Rose RJ. The effects of overtraining on blood volumes in Standardbred racehorse. *Equine Vet. J.*, 165(3):228-232, 2003.
- Gomez-Cuetara CA, Rodriguez A, Santiago I, Mateos E, Serres C. Refrigeration of Zamorano-Leones donkey semen collected with an open-ended artificial vagina. 8th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR), *Reprod. Domest. Anim.*, 39:267, 2004.
- Gonzalez F, Rodriguez C, Lucas JJ, Waxman S, San Andres MD, Serres C, Nieto J, San Andrés MI. Pharmacokinetics of a single intravenous dose of marbofloxacin in adult donkeys. *Vet. Rec.*, 161(4):133-136, 2007.
- Gorman ME, Villarroel A, Tornquist SJ, Flachsbar J, Warden A, Boeder L. Comparison between manual and automated total nucleated cell counts using the ADVIA 120 for pleural and peritoneal fluid samples from dogs, cats, horses, and alpacas. *Vet. Clin. Pathol.*, 38(3): 388-391, 2009.
- Gregoire C, Chasson L, Luci C, Tomasello E, Geissmann F, Vivier E, Walzer T. The trafficking of natural killer cells. *Immunol. Rev.*, 220:169-182, 2007.
- Greppi GF, Casini L, Gatta D, Orlandi M, Pasquini, M. Daily fluctuations of haematology and blood biochemistry in horses fed varying levels of protein. *Equine Vet. J.*, 28(5):350-353, 1996.

- Grint NJ, Johnson CB, Clutton RE, Whay HR, Murrell JC. Spontaneous electroencephalographic changes in a castration model as an indicator of nociception: a comparison between donkeys and ponies. *Equine Vet. J.*, 47(1):36-42, 2015.
- Grondin TM, DeWitt SF, Keeton KS. Pelger - Huët anomaly in an Arabian horse. *Vet. Clin. Pathol.*, 36(3):306-310, 2007.
- Grondin TM, Dewitt SF. Normal hematology of the horse and donkey. In: Schalm's Veterinary Hematology. Weiss DJ, Wardrop KJ (eds), 6th ed., 2010. Wiley-Blackwell. Iowa, USA.
- Groves C, Grubb P. Ungulate Taxonomy, 2011. Johns Hopkins University Press. Maryland, USA.
- Guelfi JF, Trummel C. Comparative study of the hemogram: QBC VetAutoread versus manual methods. *Rev. Med. Vet.*, 146(11):765-770, 1995.
- Gupta AK, Varshney JP, Ghei JC. Some haematobiochemical studies in Indian donkeys, (*Equus asinus*). *Indian Vet. J.*, 69(1):21-24, 1992.
- Harvey J. Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas. Harvey JW (eds), 2012. Saunders/Elsevier, St. Louis. USA.
- Harvey JW, Asquith RL, McNulty PK, Kivipelto J, Bauer JE. Haematology of foals up to one year old. *Equine Vet. J.*, 16(4):347-353, 1984.
- Harvey JW, Asquith RL, McNulty PK, Kivipelto J, Bauer, JE. Haematology of the foals up to one year old. *Equine Vet. J.*, 16(4):347-353, 1984.
- Harvey JW, Asquith RL, Pate MG, Kivipelto J, Chen CL, Ott EA. Haematological findings in pregnant, postparturient and nursing mares. *Comp. Clin. Pathol.*, 4(1):25-29, 1994.
- Harvey JW, Stockham SL, Scott MA, Johnson PJ, Donald JJ, Ott EA. Methemoglobinemia and eccentrocytosis in equine erythrocyte flavin adenine dinucleotide deficiency. *Vet. Pathol.*, 40(6):632-642, 2003.
- Harvey JW. Normal hematologic values In: Equine Clinical Neonatology. Koterba AM, Drummond WH, Kosch PC (eds), 1990. Lea & Febiger. Philadelphia, UK.
- Harvey JW. Pathogenesis, laboratory diagnosis, and clinical implications of erythrocyte enzyme deficiencies in dogs, cats, and horses. *Vet. Clin. Pathol.*, 35(2):144-156, 2006.
- Hawkey CM, Bennett PM, Gascoyne SC, Hart MG, Kirkwood JK. Erythrocyte size, number and haemoglobin content in vertebrates. *Br. J. Haematol.*, 77(3):392-397, 1991.

- Henze A, Aumer F, Grabner A, Raila J, Schweigert FJ. Genetic differences in the serum proteome of horses, donkeys and mules are detectable by protein profiling. *Br. J. Nutr.*, 106(1):170-173, 2011.
- Hinchcliff KW, Kociba GJ, Mitten LA. Diagnosis of EDTA-dependent pseudothrombocytopenia in a horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 203(12):1715-1716, 1993.
- Hoque MA, Bari MS, Hossain ME. Haemato-biochemical profiles of indigenous goats (*Capra hircus*) at Chittagong, Bangladesh. *Vet. World*, 6(10):789-793, 2013.
- Horobin RW. How Romanowsky stains work and why they remain valuable - including a proposed universal Romanowsky staining mechanism and a rational troubleshooting scheme. *Biotech. Histochem.*, 86(1):36-51, 2011.
- Horspool LJ, McKellar QA. Disposition of oxytetracycline in horses, ponies and donkeys after intravenous administration. *Equine Vet. J.*, 22(4):284-285, 1990.
- Horspool LJ, Sarasola P, McKellar QA. Disposition of ampicillin sodium in horses, ponies and donkeys after intravenous administration. *Equine Vet. J.* 24(11):59-61, 1992.
- Horspool LJ, Taylor DJ, McKellar QA. Plasma disposition of amikacin and interactions with gastrointestinal microflora in Equidae following intravenous and oral administration. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 17(4):291-298, 1994.
- Horspool LJI, McKellar QA. Disposition of penicillin G sodium following intravenous and oral administration to equidae. *Br. Vet. J.*, 151(4):401-412, 1995.
- Hou M, Andersson PO, Stockelberg D, Mellqvist UH, Ridell B, Wadenvik H. Plasma thrombopoietin levels in thrombocytopenic states: implication for a regulatory role of bone marrow megakaryocytes. *Br. J. Haematol.*, 101(3):420-424, 1998.
- Hu ZQ, Zhao WH, Shimamura T. Regulation of mast cell development by inflammatory factors. *Curr. Med. Chem.*, 14(28):3044-3050, 2007.
- Hultén C, Demmers S. Serum amyloid A (SAA) as an aid in the management of infectious disease in the foal: comparison with total leucocyte count, neutrophil count and fibrinogen. *Equine Vet. J.*, 34(7):693-698, 2002.
- Hyloft PP, Stöckl D, Blaabjerg O, Pedersen B, Birkemose E, Thienpont L, Lassen JF, Kjeldsen J. Graphical interpretation of analytical data from comparison of a field method with a reference method by use of difference lots. *Clin. Chem.*, 43(11): 2039-2046, 1997.
- International Committee for Standardization in Haematology; Expert Panel on Haemoglobinometry. Recommendations for reference method for haemoglobinometry in

- human blood (ICSH standard 1986) and specifications for international haemiglobincyanide reference preparation (3rd edition). *Clin. Lab. Haematol.*, 9(1):73-79, 1987.
- ISO. Medical Laboratories – Particular Requirements for Quality and Competence ISO 15189. Geneva: ISO, 2012.
- Jacobs RM, Lumsden JH, Grift E. Effects of bilirubinemia, hemolysis, and lipemia on clinical chemistry analytes in bovine, canine, equine, and feline sera. *Can. Vet. J.*, 33(9):605-608,1992.
- Jain NC. Comparative hematology of common domestic animals In: Essentials of Veterinary Hematology. Jain NC (eds), 1993. Lea and Febiger. Philadelphia, UK.
- Jain NC. The horse, normal hematology with comments on response to disease In Schalm's Veterinary Hematology. Jain NC (eds), 4th ed, 1986. Lea and Febiger. Philadelphia, UK.
- Jeffcott LB. Clinical haematology of the horse In: Comparative Clinical Haematology. Archer RK, Jeffcott LB (eds), 1977. Blackwell Scientific Publications.UK.
- Jelkmann W. Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur. J. Haematol.*, 78(3):183-205, 2007.
- Johnstone RM, Mathew A, Mason AB, Teng K. Exosome formation during maturation of mammalian and avian reticulocytes: evidence that exosome release is a major route for externalization of obsolete membrane proteins . *J. Cell Physiol.*, 147(1):27-36, 1991.
- Jones R, Payne B. Clinical investigation and statistics in laboratory medicine. Jones R, Payne B (eds) 1997. ACB Publications, London.
- Joubert KE, Briggs P, Gerver D, Gottschalk RG. The sedative and analgesic effects of detomidine-butorphanol and detomidine alone in donkeys. *J. S. Afr. Vet. Ass.*, 70(3):112-118, 1999.
- June V, Soderholm V, Hintz HF, Butler WR. Glucose tolerance in the horse, pony and donkey. *Equine Vet. Sci.*, 12(2):103-105, 1992.
- Kalinkovich A, Spiegel A, Shivtiel S, Kollet O, Jordaney N, Piacibello W, Lapidot T. Blood-forming stem cells are nervous: direct and indirect regulation of immature human CD34+ cells by the nervous system. *Brain. Behav. Immun.*, 23(8):1059-1065, 2009.
- Kang SH, Kim HK, Ham CK, Lee DS, Cho HI. Comparison of four hematology analyzers, CELL-DYN Sapphire, ADVIA 120, Coulter LH 750, and Sysmex XE-2100, in terms of clinical usefulness. *Int. J. Lab. Hematol.*, 30(6):480-486, 2008.

- Kankaanranta H, Moilanen E, Zhang X. Pharmacological regulation of human eosinophil apoptosis. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*, 4(4):433-445, 2005.
- Kasirer-Izraely H, Choshniak I, Shkolnik A. Dehydration and rehydration in donkeys: the role of the hind gut as a water reservoir. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.*, 5(1):89-100, 1994.
- Kastner M, Maurer HR. Pure bovine granulocytes as a source of granulopoiesis inhibitor (chalone). *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.*, 361(2):197-200, 1980.
- Katyukhin LN, Kazenow AM, Maslove MN, Matskevich YA. Rheologic properties of mammalian erythrocytes: relationship to transport ATPases. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 120(3):493-498, 1998.
- Kaushansky K. Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood*, 111(3):981-986, 2008.
- Kerr MG, Snow DH. Alterations in haematocrit, plasma proteins and electrolytes in horses following the feeding of hay. *Vet. Rec.*, 110(1):538-540, 1982.
- Kiguwa SL, Hextall P, Smith AL, Critcher R, Swinburne J, Millon L, Binns MM, Goodfellow PN, McCarthy LC, Farr CJ, Oakenfull E. A horse whole-genome-radiation hybrid panel: chromosome 1 and 10 preliminary maps. *Mamm. Genome*, 11(9):803-805, 2000.
- Kim DH, Yoo KH, Choi KS, Kim DH, Yoo KH, , Yang SE, Yang YS, Im HJ, Kim KH, Jung HL, Sung KW, Koo HH. Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell. *Cytokine*, 31(2):119-126, 2005.
- King SM, Reed GL. Development of platelet secretory granules. *Semin. Cell Devel. Biol.*, 13(4):293-302, 2002.
- Klee GG, Dodge LA, Zincke H, Oesterling JE. Measurement of serum prostate-specific antigen using IMx prostate-specific antigen assay. *J. Urol.*, 151(1):94-98, 1994.
- Klingel, H. Observations on social organization and behaviour of African and Asiatic wild asses (*Equus africanus* and *E. hemionus*). *Z. Tierpsychol.*, 44(3):323-331, 1977.
- Knoll JS, Rowell SL. Clinical hematology: in-clinic analysis, quality control, reference values, and system selection. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, 26(5):981-1002, 1996.
- Koch DD, Peters T. Selection and evaluation of methods In: Tietz Textbook of Clinical Chemistry. Burtis CA, Ashwood ER (eds), 3rd ed, 1999. W.B. Saunders Company, Philadelphia, UK.

- Koepke AA, VanAssendelft OW, Brindza LJ, Davis BH, Fernandes BJ, Amy S, Rabinovith A. Reference Leukocyte (WBC) Differential Count (Proportional) and Evaluation of Instrumental Methods. 2nd ed, 2007. CLSI. Pennsylvania, USA.
- Koepke JA. Standardization of fibrinogen assays. *Eur. J. Haematol.*, 24(37):130-138, 1980.
- Kolb E. Physiologie des animaux domestiques. Vigot frères édition. France, Paris, 1975.
- Kovacs P, Brunch C, Fliedner TM. Colony formation by canine hemopoietic cells in vitro. Inhibition by polymorphonuclear leukocytes. *Acta Haematol.*, 56(2):107-115, 1976.
- Kramer JW. Normal hematology of the horse In: Shalm's Veterinary Hematology. Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC (eds), 5th ed, 2000. Williams & Wilkins. Philadelphia, UK.
- Kroll MH, Emancipator K. A theoretical evaluation of linearity. *Clin. Chem.*, 39(3):405-13, 1993.
- Kum C, Gokbulut C, Sekkin S, Boyacioglu M. Pharmacokinetics of danofloxacin following intravenous and intramuscular administration in donkeys. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 32(1):105-108, 2009.
- Kurosawa M, Nagata S, Takeda F, Mima K, Hiraga A, Makoto K, Kazuyoshi T. Plasma catecholamine, adrenocorticotropin and cortisol responses to exhaustive incremental treadmill exercise of the thoroughbred horse. *J. Vet. Med. Sci.*, 9(1):9-18, 1998.
- Kvaternick V, Pollimeier M, Fischer J, Hanson PD. Pharmacokinetics and metabolism of orally administered firocoxib, a novel second generation coxib, in horses. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 30(3):208-217, 2007.
- Lacerda L, Campos R, Sperb M, Soares E, Barbosa, E. Hematological and biochemical parameters in three high performance horse breeds from southern Brazil. *Arch. Vet. Sci. M.*, 11(2):40-44, 2006.
- Lassen ED, Swardson CJ. Hematology and hemostasis in the horse: normal functions and common abnormalities. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, 11(3):351-389, 1995.
- Latimer KS, Rakich PM. Peripheral blood smears In: Cytology and Hematology of the Horse. Cowell RL, Tyler RD (eds), 1992. American Veterinary Publications. California, USA.
- Latimer KS. Leukocytic hematopoiesis In: Equine Medicine and Surgery. King C (ed.), 1999. Mosby. St. Louis, USA.
- Laus FSA, Faillace V, Paggi E, Serri E, Vullo C, Spaterna A, Cerquetella M Beniamino T. Reference values for hematological and biochemical parameters of mixed breed donkeys (*Equus asinus*). *Wulfenia Journal*, 22(1):294-304, 2015.

- Lavy E, Ziv G, Aroch I, Glickman A. Pharmacokinetics, intramuscular bioavailability, and bioequivalence of amoxicillin in donkeys. *J. Vet. Med. B.*, 42(5):284-292, 1995a.
- Lavy E, Ziv G, Glickman A. Intravenous disposition kinetics, oral and intramuscular bioavailability and urinary excretion of norfloxacin nicotinate in donkeys. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 18(2):101-107, 1995b.
- Layton JE, Hockman H, Sheridan WP, Morstyn G. Evidence for a novel control mechanism of granulopoiesis: mature cell related control of a regulatory growth factor. *Blood*, 74(4):1303-1307, 1989.
- Lé vesque JP, Winkler IG, Larsen SR, Rasko JE. Mobilization of bone marrow - derived progenitors. *Handbook Exp. Pharmacol.*, 180:3-36, 2007.
- Leberbauer C, Boulme F, Unfried G, Huber J, Beug H, Müllner EW. Different steroids co-regulate long-term expansion versus terminal differentiation in primary human erythroid progenitors. *Blood*, 105(1):85-94, 2005.
- Lebien TW. Lymphopoiesis In: Williams Hematology. Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ (eds), 7th ed, 2006. McGraw-Hill. New York, USA.
- Lemma A, Moges M. Clinical, hematological and serum biochemical reference values of working donkeys (*Equus asinus*) owned by transport operators in Addis Ababa, Ethiopia. *Livest. Res. Rural. Dev.*, 21(8):1-12, 2009.
- Levine RA, Hatt AH, Wardlaw SC. Quantitative buffy coat analysis of blood collected from dogs, cats, and horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 189(6):670-673, 1986.
- Lilliehook I, Tvedten H. Validation of the Sysmex XT- 2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. I. Erythrocytes, platelets, and total leukocyte counts. *Vet. Clin. Pathol.*, 38(2):163-174, 2009a.
- Lilliehook I, Tvedten H. Validation of the Sysmex XT- 2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. II. Differential leukocyte counts. *Vet. Clin. Pathol.*, 38(2):175-182. 2009b.
- Lin LI. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics*, 45(1), 255-268, 1989.
- Lindsay EF, Clayton HM. An anatomical and endoscopic study of the nasopharynx and larynx of the donkey (*Equus asinus*). *J. Anat.*, 144:123-132, 1986.
- Linnet K. Evaluation of the linear relationship between the measurements of two methods with proportional errors. *Stat. Med.*, 9(12):1463-1473, 1990.

- Linnet K. Performance of Deming regression analysis in case of misspecified analytical error ratio in method comparison studies. *Clin. Chem.*, 44(5):1024-1031, 1998.
- Lionetti L, Cavaliere G, Bergamo P, Trinchese G, De Filippo C, Gifuni G, Gaita M, Pignalosa A, Donizzetti I, Putti R, Di Palo R, Barletta A, Mollica MP. Diet supplementation with donkey milk upregulates liver mitochondrial uncoupling, reduces energy efficiency and improves antioxidant and antiinflammatory defences in rats. *Mol. Nutr. Food. Res.*, 56(10):1596-1600, 2012.
- Listado “Domestic Animal Diversity Information System” (DAD-IS) de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (<http://dad.fao.org/>).
- Lizarraga I, Sumano H, Brumbaugh GW. Pharmacological and pharmacokinetic differences between donkeys and horses. *Equine Vet. Edu.*, 16(2):102-112, 2004.
- Lloyd L, Johnson W B, Young W, Mohrison H. SecoND Report of the Tsetse-fly Investigations in the Northem Provinces of Nigeria. *Bull. Ent. Res.*, 16(1):1-27, 1924.
- Lumsden JH. Laboratory Test Methos Validation. *Rev. Met. Vet.*, 151(7):623-630, 2000.
- Mandell GI, Petri WA. Sulfonamides, trimethoprim sulfamethoxazole, quinolones, and agents for urinary tract infections In *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. JG Hardman, LE Limgird (eds), 9th ed, 1996. McGraw-Hill. New York.
- Marcandier M, Bideau L, Dubreuil Y. Applications de la photometrie a la numeration des hemities. *C. R. Soc. Biol. Paris.*, 99:741, 1928.
- Mariella J, Pirrone A, Gentilini F, Castagnetti, C. Hematologic and biochemical profiles in standardbred mares during peripartum. *Theriogenology*, 81(4):526-534, 2014.
- Martínez-Subiela S, Cerón J. Effects of hemolysis, lipemia, hyperbilirrubinemia, and anticoagulants in canine C-reactive protein, serum amyloid A, and ceruloplasmin assays. *Can. Vet. J.*, 46(7):625-629, 2005.
- Masoni F, Lagadic M, Plassiart G, Guigand L, Wyers M. Paramètres hématologiques de la chèvre laitière: Variations physiologiques chez l'animal. *Rec. Méd. Vét.*, 161(1):41-49, 1985.
- Matthews NS, Grosenbaugh DA, Kvaternick V, Taylor TS. Pharmacokinetics and oral bioavailability of firocoxib in donkeys. *10th World Congress of Veterinary Anaesthesia*, Glasgow, UK, 2009.
- Matthews NS, Peck KE, Mealey KL, Taylor TS, Ray AC. Pharmacokinetics and cardiopulmonary effects of guaifenesin in donkeys. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 20(6):442-446, 1997a.

- Matthews NS, Taylor TS, Hartsfield SM. Anaesthesia of donkeys and mules. *Equine Vet. Educ.*, 9(4):198-202, 1997b.
- Matthews NS, Peck KE, Taylor TS, Mealey KL. Pharmacokinetics of phenylbutazone and its metabolite oxyphenbutazone in miniature donkeys. *Am. J. Vet. Res.*, 62(5):673-675, 2001.
- Matthews NS, Taylor TS, Sullivan JA. A comparison of three combinations of injectable anaesthetics in miniature donkeys. *Vet. Anaesth. Analg.*, 29(1):36-42, 2002.
- McClure JJ, Koch C, Traub-Dargatz J. Characterization of a red blood cell antigen in donkeys and mules associated with neonatal isoerythrolysis. *Anim. Genet.*, 25(2):119-120, 1994.
- McFarlane D, Sellon DC, Gaffney D. Hematologic and serum biochemical variables and plasma corticotropin concentration in healthy aged horses. *Am. J. Vet. Res.*, 59(9):1247-1251, 1998.
- McGorum BC, Dixon PM, Halliwell RE. Phenotypic analysis of peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes in control and chronic obstructive pulmonary disease affected horses, before and after 'natural (hay and straw) challenges'. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 36(3):207-222, 1993.
- McGuire TC, Henson JB, Keown GH. Equine infectious anaemia: the role of Heinz bodies in the pathogenesis of anaemia. *Res. Vet. Sci.*, 11(4):354-357, 1970.
- McKeever KH, Hinchcliff KW, Reed SM, Robertin JT. Role of decreased plasma volume in haematocrit alterations during incremental treadmill exercise in horses. *Am. J. Physiol.*, 265(2):404-408, 1993.
- McKeever KH. Endocrine alterations in the equine athlete: an update. *Vet. Clin. N. Am-Equine*, 27(1):197-218, 2011.
- Meadows RL, Young K. Eosinophilia and their disorders In: Schalm's Veterinary Hematology. Weiss DJ, Wardrop KJ (eds), 6th ed, 2010. Wiley-Blackwell. Iowa, USA.
- Mealey KL, Matthews NS, Peck KE, Burchfield ML, Bennett BS, Taylor TS. Pharmacokinetics of R(-) and S(+) carprofen after administration of racemic carprofen in donkeys and horses. *Am. J. Vet. Res.*, 65(11):1479-1482, 2004.
- Mealey KL, Matthews NS, Peck KE, Ray AC, Taylor TS. Comparative pharmacokinetics of phenylbutazone and its metabolite oxyphenbutazone in clinically normal horses and donkeys. *Am. J. Vet. Res.*, 58(1):53-55, 1997.

- Mello SLV, Henry M, Souza MC, Oliveira SMP. Effect of split ejaculation and seminal extenders on longevity of donkey semen preserved at 5°C. *C. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 52(4): 372-378, 2000.
- Mendoza FJ, Estepa JC, Gonzalez-De Cara CA, Aguilera-Aguilera R, Toribio RE, Pérez-Écija A. Energy-related parameters and their association with age, gender, and morphometric measurements in healthy donkeys. *Vet. J.*, 204(2):201-207, 2015.
- Mendoza FJ, Pérez-Écija RA, Toribio RE, Estepa JC. Thyroid hormone concentration differ between donkeys and horses. *Equine Vet. J.*, 25(3):670-670, 2012.
- Messer NT, Arnold K. Immune-mediated hemolytic anemia in a horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 198:1415-1416, 1991.
- Miro J, Taberner E, Rivera M, Pena A, Medrano A, Rigau T, Peñalba A. Effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure of motile sperm cell subpopulations in refrigerated Catalonian donkey semen. *Theriogenology*, 72(8):1017-1022, 2009.
- Mohandas N, Kim YR, Tycko DH, Orlik J, Wyatt J, Groner W. Accurate and independent measurement of volume and hemoglobin concentration of individual red cells by laser light scattering. *Blood*, 68(2):506-513, 1986.
- Monreal L, Villatoro AJ, Monreal M, Espada Y, Anglés AM, Ruiz-Gopegui R. Comparison of the effects of low - molecular - weight and unfractionated heparin in horses. *Am. J. Vet. Res.*, 56(10):1281-1285, 1995.
- Mori E, Fernandes WR, Mirandola RMS, Renaide R, Ferreira RR, Gacek F. Reference values on Hematologic Parameters of Brazilian donkey (*Equus asinus*) breed. *J. Equine Vet. Sci.*, 24(7):2271-2276, 2004.
- Muyllé S, Simoens P, Lauwers H, Van Loon G. Age determination in mini-Shetland ponies and donkeys. *Zentralbl. Veterinarmed. A.*, 46(7):421-429, 1999.
- Nabity MB, Ramaiah SK. Neutrophil structure and biochemistry. In: Schalm's Veterinary Hematology. Weiss DJ, Wardrop KJ (eds), 6th ed, 2010. Wiley-Blackwell. Iowa, USA.
- Nanji AA, Poon R, Hinberg I. Lipaemic interference: effects of lipaemic serum and intralipid. *Clin. Pathol.*, 41(9):1026-1027, 1998.
- Nayeri GD. Blood Characteristics of the Adult Donkey. *Zbl. Vet. Med. A.* 25(2):541-547, 1978.

- NCCLS Subcommittee on Qualitative Cellular Hematology. PSH-20 Standards for Differential Leukocyte Counters. Villanova, Pa. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1980.
- NCCLS. Document EP6-P. Evaluation of the linearity of quantitative analytical methods. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA, 1986a.
- NCCLS. Document EP7-P. Interference testing in clinical chemistry. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA, 1986b.
- Neuerer FF. Evaluation of the automated hematology analyzer CELL-DYN 3500 for its clinical use in cats and dogs, Munich, Germany. Thesis work, 2005.
- Oliver G. A contribution to the study of the blood and the circulation. *Lancet*, 147(3799):1699-1706, 1896.
- Olmos G, McDonald G, Elphick F, Gregory NG, Burden FA. A case study to investigate how behaviour in donkeys changes through progression of disease In: *Proceedings of 45th Congress of the International Society for Applied Ethology*, 2011.
- Olver C, Gordon A, Smith JE, Kaneko J. Erythrocyte structure and function In: Schalm's Veterinary hematology. Weiss DJ, Wardrop KJ (eds), 6th ed, 2010. Wiley-Blackwell. Iowa, USA.
- Olver SC. Erythropoiesis In: Schalm's Veterinary Hematology. Weiss DJ, Wardrop KJ (eds), 6th ed, 2010. Wiley-Blackwell. Iowa, USA.
- Orlandi M, Leotta R, Berni P, Curadi MC. Profilo metabolico nell'asino amiatino [Toscana]. *Ann. Fac. Med. Vet. Pisa.*, 50(1):47-53, 1997.
- Oukessou M, Aissa M, Hmidouch A. Pharmacokinetic study of benzylpenicillin and amoxicillin in the donkey (*Equus asinus*). *Indian. Vet. J.*, 71(1):1077-1081, 1994.
- Oukessou M, Bouljihad M, Gool FV, Alvinerie M. Pharmacokinetics of ketoprofen in the donkey (*Equus asinus*). *J. Vet. Med. A.*, 43(7):423-426, 1996.
- Papasouliotis K, Cue S, Crawford E, Pinches M, Dumont M, Burley K. Comparison of white blood cell differential percentages determined by the in-house LaserCyte hematology analyzer and a manual method. *Vet. Clin. Pathol.*, 35(3):295-302, 2006.
- Papenfuss TL. Monocytes and dendritic cell production and distribution. In: Schalm's Veterinary Hematology. Weiss DJ, Wardrop KJ (eds), 6th ed, 2010. Wiley-Blackwell, Iowa, USA.
- Parry DM. The Quality Goal Index – Its Use in Benchmarking and Improving Sigma Quality Performance of Automated Analytic Tests, 2016.

- Pearson TC, Guthrie DL. Trapped plasma in the microhematocrit. *Am. J. Clin. Pathol.*, 78(5):770-772, 1982.
- Peck KE, Matthews NS, Taylor TS, Mealey KL. Pharmacokinetics of sulfamethoxazole and trimethoprim in donkeys, mules, and horses. *Am. J. Vet. Res.*, 63(3):349-353, 2002.
- Perkins SL. Examination of the blood and bone marrow In Wintrobe's clinical hematology, Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B (ads), 11th ed, 2004. Lipincott Williams and Wilkins. Philadelphia.USA.
- Persson S. On blood volume and working capacity in horses. Studies of methodology and physiological and pathological variations. *Acta Vet. Scand. Suppl.*, 19:19-189, 1967.
- Piccione G, Casella S, Giannetto C, Assenza A, Caola G. Effect of different storage conditions on platelet aggregation in horse. *J. Equine Vet. Sci.*, 30(7):371-375, 2010.
- Piccione G, Vazzana I, Giannetto C, Giancesella M, Ferrantelli V. Modification of some haematological and haematochemical parameters in horse during long distance rides. *Res. J. Vet. Sci.*, 1(1):37-43, 2008.
- Piety NC, Gifford SC, Yang X, Shevkopyas SS. Quantifying morphological heterogeneity: a study of more than 1.000.000 individual stored red blood cells. *Vox. Sang.*, 109(3):221-230, 2015.
- Pitel P, Moulin M, Valette J, Dumontier S, Petit L, Fortier G, Couroucé-Malblanc A. Approche des valeurs hématologiques et biochimiques chez deux races asines. *Pratique Vétérinaire Équine*, 38(149):19-24, 2006.
- Pollock MA, Jefferson SG, Kane JW, Lomax K, MacKinnin G, Winnard CB. Method comparison—a different approach. *Ann. Clin. Biochem.*, 29(1):556-560, 1992.
- Prasse KW, George LW, Whitlock RH. Idiopathic hypersegmentation of neutrophils in a horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 178(3):303-305, 1981.
- Prewitt JM, Mendlesohn ML. The analysis of cell images. *Ann. New York Acad. Sci.*, 128(3):1035-1053, 1966.
- Prosser CG, McLaren RD. Insulin-like growth factor binding proteins of equine serum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 189(3):1255-1260, 1992.
- Rabinovitch A, Barnes P, Curcio KM, Dorman J, Huisman A, Nguyen L, O'Neil P. Validation, Verification, and Quality Assurance of Automated Hematology Analyzers; H26-A2. Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010.

- Radin M, Wellman ML. Granulopoiesis In: Schalm's Veterinary Hematology. Weiss DJ, Wardrop KJ (eds), 6th ed, 2010. Wiley-Blackwell. Iowa, USA.
- Radin MJ, Eubank MC, Weiser MG. Electronic measurement of erythrocyte volume and volume heterogeneity in horses during erythrocyte regeneration associated with experimental anemias. *Vet. Pathol.*, 23(6):656-660, 1986.
- RAIA. Registro Andaluz de Identificación Animal. (www.raia.es).
- Ralston SL, Nockels CF, Squires EL. Differences in diagnostic test results and haematologic data between aged and young horses. *Am. J. Vet. Res.*, 49(8):1387-1392, 1988.
- Ramirez S, Gaunt SD, McClure JJ, Oliver J. Detection and effects on platelet function of anti-platelet antibody in mule foals with experimentally induced neonatal alloimmune thrombocytopenia. *J. Vet. Intern. Med.*, 13(6):534-539, 1999.
- Reagan WJ, Carter C, Turek J. Eccentricity in equine red maple leaf toxicosis. *Vet. Clin. Pathol.*, 23(4):123-127, 1994.
- Reagan WJ. Recent advances in hematology instrumentation In: *Proceedings of the American College of Veterinary Internal Medicine Forum*, 1999.
- Reid SW, Mohammed HO. Survival analysis approach to risk factors associated with hyperlipemia in donkeys. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 209(8):1449-1452, 1996.
- Renner-Martin TF, Forstenpointner G, Weissengruber GE, Eberhardt L. Gross anatomy of the female genital organs of the domestic donkey (*Equus asinus* Linné, 1758). *Anat. Histol. Embryol.*, 38(2):133-138, 2009.
- Ricketts S. Guide to Equine Clinical Pathology. Newmarket, UK, 2006.
- Riegel CM, Stockham SL. Anemia associated with bacteria and viral infections. In: Schalm's Veterinary Hematology. Weiss DJ, Wardrop KJ (eds), 6th ed, 2010. Wiley-Blackwell, Iowa, USA.
- Riond B, Weissenbacher S, Hofmann-Lehmann R, Lutz H. Performance evaluation of the Sysmex pocH-100iV Diff hematology analyzer for analysis of canine, feline, equine, and bovine blood. *Vet. Clin. Pathol.*, 40(4):484-495, 2011.
- Rishniw M, Pion P. Evaluation of performance of veterinary in-clinic hematology analyzers. *Vet. Clin. Pathol.*, 45(4):604-614, 2016.
- Robert C, Goachet A.G, Fraipont A, Votion D.M, Van Erck, Leclerc JL. Hydration and electrolyte balance in horses during an endurance season. *Equine Vet. J.*, 42(38):98-104, 2010.

- Rong R, Chandley AC, Song J, McBeath S, Tan PP, Bai Q, Speed RM. A fertile mule and hinny in China. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 47(3):134-139, 1988.
- Rose RJ, Allen JR. Hematologic responses to exercise and training. *Vet. Clin. N. Am. Equine Pract.*, 1(3): 461-477, 1983.
- Rose RJ, Hodgson DR. Hematology and biochemistry In: The Athletic Horse: Principles and Practice of Equine Sports Medicine. Hodgson DR, Rose RJ (eds), 1994. W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA.
- Rosers JF, Papkoff H, Murhy HM, Chang YS, Chloupek RC, Potes JA. Chemical, biological and immunological properties of pituitary gonadotropins from the donkey (*Equus asinus*): comparison with the horse (*Equus caballus*). *Bio. Reprod.*, 30(5):1253-1262, 1984.
- Rossdale PD, Burguez PN, Cash RS. Changes in blood neutrophil-lymphocyte ratio related to adrenocortical function in the horse. *Equine Vet. J.*, 14(4): 293-298, 1982.
- Rossel S, Marshall F, Peters J, Pilgram T, Adams M.D, O'Connor D. Domestication of the donkey: Timing, processes, and indicators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105(10):3715-3720, 2008.
- Rota A, Magelli C, Panzani D, Camillo. F. Effect of extender, centrifugation and removal of seminal plasma on cooled-preserved Amiata donkey spermatozoa. *Theriogenology*, 69(2):176-185, 2008.
- Roy S, Roy M, Mishra, S. Hematological and biochemical profile during gestation period in Sahiwal cows. *Vet. World*, 3(1):26-28, 2010.
- Ryder OA, Chemnick LG, Bowling AT, Benirschke K. Male mule foal qualifies as the offspring of a female mule and jack donkey. *J. Hered.*, 76(5):379-381, 1985.
- Ryder OA, Epel NC, Benirschke K. Chromosome banding studies of the Equidae. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 20(1-6):332-350, 1978.
- Said AH, Shokry M, Saleh MA. Contribution to the nasolacrimal duct of donkeys in Egypt. *Anat. Histol. Embryol.*, 6(4):347-350, 1977.
- Salem M, Chernow B, Burke R, Stacey J, Slogoff M, Sood S. Bedside diagnostic blood testing: Its accuracy, rapidity, and utility in blood conservation. *JAMA*, 266(3):382-389, 1991.
- Schalm OW, Carlson GP. The blood and the blood forming organs. *Equine Medicine and Surgery, American Veterinary Publications*, 377-414, 1982.
- Schalm OW, Jain N, Carroll E. Veterinary Hematology. Bouton M, Oldenburg P (eds), 3rd ed, 1975. Lea and Febiger, Philadelphia, USA.

- Segura D, Monreal L, Armengou L, Tarancón I, Brugués R, Escolar G. Mean platelet component as an indicator of platelet activation in foals and adult horses. *J. Vet. Intern. Med.*, 21(5):1076-1082, 2007.
- Serres C, Rodriguez A, Alvarez A.L, Santiago I, Gabriel J, Gómez-Cuetara C, Mateos E. Effect of centrifugation and temperature on the motility and plasma membrane integrity of Zamorano-Leones donkey semen. *Theriogenology*, 58(1):329-332, 2002.
- Sharif M, Ameri M, Moshfeghi S, Sharifi H, Mohammad S, Alavi S. Artifactual changes in haematological variables in equine blood samples stored at different temperatures and various anticoagulants. *Comp. Clin. Path.*, 21(4):449-452, 2010.
- Shoukri MM, Pause CA. Statistical methods for health sciences. Shoukri MM, Pause CA(eds), 2nd ed, 1999. CRC Press, London, UK.
- Shoukry M, Saleh M, Fouad K. Epidural anesthesia in donkeys. *Vet. Rec.*, 97(23):450-452, 1975.
- Shull K. Biochemical changes in equine erythrocytes during experimental anemia. *Cornell Vet.*, 71(3):280-287, 1981.
- Silver M, Ousey JC, Dudan, FE. Studies on equine prematurity 2: post natal adrenocortical activity in relation to plasma adrenocorticotrophic hormone and catecholamine levels in terms and premature foals. *Equine Vet. J.*, 16(4):278-286, 1984.
- Sinclair MD, Mealey KL, Matthews NS, Peck KE, Taylor TS, Ken E, Peck MS, Brad S, Bennett, MS. Comparative pharmacokinetics of meloxicam in clinically normal horses and donkeys. *Am. J. Vet. Res.*, 67(6):1082-1085, 2006.
- Smith J, Erickson H, Debowes R. Changes in circulating equine erythrocytes induced by brief, high speed exercise. *Equine Vet. J.*, 21(6):444-446, 1989.
- Smith JE, Agar NS. Studies on erythrocyte metabolism following acute blood loss in the horse. *Equine Vet. J.*, 8(1):34-37, 1976.
- Snow DH, Kerr MG, Nimmo MA, Abbott EM. Alterations in blood, sweat, urine and muscle composition during prolonged exercise in the horse. *Vet. Rec.*, 110(16):377-384, 1982.
- Snow DH, Ricketts SW, Douglas TA. Post-race biochemistry in thoroughbreds In: Equine Exercise Physiology. Snow DH, Persson SGB, Rose RJ (eds), 1983. Granta Editions. Cambridge, UK.
- Stanišić L, Dimitrijević V, Simeunović P, Lakić N, Radović I, Ivanković A, Stevanović J, Stanimirović Z. Morphological, biochemical and hematological characterization of endangered Balkan donkey breed. *Acta Vet. Beograd.*, 65(1):125-136, 2015.

- Steinberg JD, Olver CS. Hematologic and biochemical abnormalities indicating iron deficiency are associated with decreased reticulocyte hemoglobin content (CHr) and reticulocyte volume (rMCV) in dogs. *Vet. Clin. Pathol.*, 34(1):23-27, 2005.
- Stewart GA, Clarkson GT, Steel JD. Hematology of the race horse and factors affecting interpretation of the blood count In: *Proceeding of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, 1970.
- Stirn M, Moritz A, Bauer N. Rate of manual leukocyte differentials in dog, cat and horse blood samples using ADVIA 120 cytograms. *BMC Vet. Res.*, 10:125, 2014.
- Stockham SL, Harvey JW, Kinden DA. Equine glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Vet Pathol.* 31(5):518-527, 1994.
- Stöckl D, Reinauer H. Development of criteria for the evaluation of reference method values. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 53(212):16-18, 1993.
- Straub R, Gerber H, Petitjean J. Serum-lipids in horses, ponies, donkeys, and mules In: *Proceedings of the 1st Int Symp Equine Hematol*, 1977.
- Strike PW. Statistical methods in laboratory medicine. Strike PW (eds), 1991. Elsevier. Aylesbury, UK.
- Svendsen ED. 'Donkeys Abroad' In: Professional Handbook of the Donkey. Svendsen ED (eds), 3rd ed, 1997. Whittet Books Ltd, London, UK.
- Svendsen ED. Work to improve the condition of donkeys and mules worldwide. In: Donkeys, mules and horses in tropical agricultural development. Fielding D, Pearson RA (eds), 1991. University of Edinburgh. UK.
- Swank R, Roth E. Hemolysis and Alimentary Lipemia Effects of Incubation, Heparin, and Protamine. *Blood*, 9(4):348-361, 1954.
- Takayama TK, Vessella RL, Lange PH. Newer applications of serum prostate-specific antigen in the management of prostate cancer. *Semin. Oncol.*, 21(5):542-553, 1994.
- Tamzali Y, Guelfi JF, Braun JP. Plasma fibrinogen measurement in the horse: comparison of Millar's technique with a chronometric technique and the QBC-Vet Autoreader. *Res. Vet. Sci.*, 71(3):213-217, 2001.
- Taylor TS, Matthews NS. Mammoth asses - selected behavioural considerations for the veterinarian. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 60(2-3):283-289, 1998.
- Taylor-Macallister C, Macallister CG, Walker D, Aalseth D. Haematology and serum biochemistry evaluation in normal postpartum mares. *Equine Vet. J.*, 29(3):234-235, 1997.

- Tonks DB. A quality control program for quantitative clinical chemistry estimations. *Can. J. Med. Tech.*, 30(2):38-54, 1968.
- Toutain PL, Ferran A, Bousquet-Me'lou A. Species Differences in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics In *Comparative and Veterinary Pharmacology (Handbook of Experimental Pharmacology)*. Cunningham F, Elliott J and Lees P (eds), 2010. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany.
- Traub-Dargatz JL, McClure JJ, Koch C, Schlipf JW Jr. Neonatal isoerythrolysis in mule foals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 206(1):67-70,1995.
- Trautman ED, Newbower RS. A practical analysis of the electrical conductivity of blood. *Trans. Biomed. Eng.*, 30(3):141-154, 1983.
- Trawford AF, Mulugeta G. Parasites In: *The Professional Handbook of the Donkey*. Duncan J, Hadrill D (eds), 4th ed, 2008. ED Svendsen, Whittet Books. Wiltshire, UK.
- Trum BF. Normal variances in horse blood due to breed, age, lactation, pregnancy and altitude. *Am. J. Vet. Res.*, 13(49):514-519, 1952.
- Turnbull A, Wernery U, Wernery R, Anandh JP, Kinne J. Survey of six infectious diseases of feral donkeys in the United Arab Emirates. *Equine Vet. Educ.*, 14(1):33-38, 2002.
- Tvedten H, Haines C. Canine automated differential leukocyte count: Studyusinga hematology analyzer system. *Vet. Clin. Pathol.*, 23(3):90-96, 1994.
- Tvedten H, Scott M, Boon GD. Interpretation of cytograms and histograms of erythrocytes, leukocytes and platelets In *Kirk's Current Veterinary Therapy XIII*. Bonaguara JD (eds), 2000. St. Louis, MO, WB Saunders. USA.
- Tvedten HW, Korcal D. Automated differential leukocyte count in horses, cattle, and cats using the Technicon H-1E hematology system. *Vet. Clin. Pathol.*, 25(1):14-22, 1996.
- Tvedten HW, Wilkins RJ. Automated blood cell counting systems: a comparison of the Coulter S-Plus IV, Ortho ELT-8/DS, Ortho ELT-8/WS, Technicon H-1, and Sysmex E-5,000. *Vet. Clin. Pathol.*, 17(2):47-54, 1988.
- US Department of Health and Human Services: Clinical laboratory improvements amendments of 1988. *Final rule. Laboratory requirements. Federal Register*, 57:7002-7288, 1992.
- Vap LM, Harr KE, Arnold JE, Freeman KP, Getzy K, Lester S, Friedrichs KR. Control of preanalytical and analytical factors for hematology for mammalian and nonmammalian species, hemostasis, and crossmatching in veterinary laboratories. ASVCP quality assurance guidelines. *Vet. Clin. Pathol.*, 41(1):8-17, 2012.

- Vendramini OM, Guintard C, Moreau J, Tainturier D. Cervix confirmation: a first anatomical approach in Baudet du Poitou jenny asses. *Anim. Sci.*, 66(3):741-744, 1998.
- Verbrugge SE, Huisman A. Verification and standardization of blood cell counters for routine clinical laboratory tests. *Clin. Lab. Med.*, 35(1):183-196, 2015.
- Veronesi MC, Gloria A, Panzani S, Sfirro MP, Carluccio A, Contri A. Blood analysis in newborn donkeys: hematology, biochemistry, and blood gases analysis. *Theriogenology*, 82(2):294-303, 2014.
- Vidament M, Vincent P, Martin F-X, Magistrini M, Blesbois E. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. *Anim. Reprod. Sci.*, 112(1-2): 22-35, 2009.
- Vis JY, Huisman A. Verification and quality control of routine hematology analyzers. *Int. J. Lab. Hematol.*, 38(1):100-109, 2016.
- Walton MT, Feild CA. Use of donkeys to guard sheep and goats in Texas. *Fourth Eastern Wildlife Damage Control Conference*, 43:87-94, 1989.
- Walton R. Equine Hematology In: Equine clinical Pathology. Walton R (eds), 4th ed, 2014. Wiley-Blackwell. New York, USA.
- Wassmuth AK, Riond B, Hofmann-Lehmann R, Lutz H. Evaluation of the Mythic 18 hematology analyzer for use with canine, feline, and equine samples. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 23(3):436-453, 2011.
- Weiser G, Kociba GJ. Persistent macrocytosis assessed by erythrocyte subpopulation analysis following erythrocyte regeneration in cats. *Blood*, 60(2):295-303, 1982.
- Weiser G, Kohn C, Vachon A. Erythrocyte volume distribution analysis and hematologic changes in two horses with immune-mediated hemolytic anemia. *Vet. Pathol.*, 20(4):424-433, 1983.
- Weiser G. Laboratory Technology for Veterinary Medicine In: Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. Thrall MA, Weiser G, Allison R, Campbell TW (eds), 2nd ed, 2012. Willey-Blackwell. New York, USA.
- Weiser MG, Vap LM, Thrall MA. Perspectives and advances in in-clinic laboratory diagnostic capabilities: hematology and clinical chemistry. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.*, 37(2):221-236, 2007.
- Weiss DJ, Geor R, Smith CM, McClay CB. Furosemide-induced electrolyte depletion associated with echinocytosis in horses. *Am. J. Vet. Res.*, 53(10):1769-1772, 1992.

- Weiss DJ, Moritz A. Equine immune-mediated hemolytic anemia associated with *Clostridium perfringens* infection. *Vet. Clin. Pathol.*, 32(1): 22-26, 2003.
- Weiss DJ, Souza C. Monocytes and Macrophages and Their Disorders In: Schalm's Veterinary Hematology. Weiss DJ, Wardrop KJ (eds), 6th ed, 2010. Wiley-Blackwell, Iowa, USA.
- Weiss DJ. Application of flow cytometric techniques to veterinary clinical hematology. *Vet. Clin. Pathol.*, 31(2):72-82, 2002.
- Weisert D, Becker M, Moritz A. Anämieklassifikation bei Hunden mittels automatisierter durchflusszytometrischer Retikulozytenanalyse In: *Proceedings of the 16th Jahrestagung der Fachgruppe "Innere Medizin und Klinische Labordiagnostik"* der DVG, Giessen, Germany. *Tieraerztliche Praxis*, A11–A12, 2008.
- Welfare RE, Mealey KL, Matthews NS, Taylor TS. Pharmacokinetics of gentamicin in donkeys. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 19(2):167-169, 1996.
- Welles E. Clinical interpretation of equine leucograms. In: Schalm's Veterinary Hematology. Feldman DF, Zinkl JG, Jain NC (eds), 2000. Williams & Wilkins. Philadelphia, UK.
- Welles EG, Hall AS, Carpenter DM. Canine complete blood counts: a comparison of four in-office instruments with the ADVIA 120 and manual differential counts. *Vet. Clin. Pathol.*, 38(1):20-29, 2009.
- Wenger-Riggenbach B, Hässig M, Hofmann-Lehmann R, Lutz H. Evaluation of the LaserCyte: an in-house hematology analyzer for dogs and cats. *Comp. Clin. Pathol.*, 15(2):117-129, 2006.
- Westgard JO. A method evaluation decision chart (MEDxchart) for judging method performance. *Clin. Lab. Science.*, 9(5):277-283, 1995.
- Westgard JO. Basic Method Validation. Westgard JO (eds), 2nd ed, 1999. Madison, WI. Westgard QC. USA.
- Westgard JO. Point of care in using statistics in method comparison studies. *Clin. Chem.*, 44(11):2240-2242, 1998.
- Westgard JO. Six Sigma Quality Design and Control, 2nd ed, 2006. Madison, WI. Westgard QC, USA.
- Wickler SJ, Anderson TP. Hematological changes and athletic performance in horses in response to high altitude (3.000 m). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 279(4):1176-1181, 2000.

- Woodward SL. The social system of feral asses (*Equus asinus*). *Z. Tierpsychol.*, 49(3):304-316, 1979.
- Woronzoff-Dashkoff KK. The wright-giemsa stain. Secrets revealed. *Clin. Lab. Med.*, 22(1):15-23, 2002.
- Wu JT. Assay for prostate-specific antigen (PSA): problems and possible solutions. *J. Clin. Lab. Anal.*, 8(1):51-62, 1994.
- Yakubu AS, Chafe UM. Haematological studies of donkeys in Sokoto state, Nigeria. *SJVS*, 7(1):41-45, 2008.
- Yang F, Fu B, O'Brien PC, Nie W, Ryder OA, Ferguson-Smith MA. Refined genome-wide comparative map of the domestic horse, donkey and human based on cross-species chromosome painting: insight into the occasional fertility of mules. *Chromosome Res.*, 2(1):65-76, 2004.
- Yousef MK, Dill DB, Mayes MG. Shifts in body fluids during dehydration in the burro, *Equus asinus*. *J. Appl. Physiol.*, 29(3):345-349, 1970.
- Zakari FO, Ayo JO, Rekwot PI, Kawu MU. Effects of age and season on haematological parameters of donkeys during the rainy and cold-dry seasons. *Int. J. Biometeorol.*, 59(12):1813-1824, 2015.
- Zelin M. Interferences on conductivity method of hematocrit determination Internal i-STAT report, 1992.
- Zeng SG, Zeng TT, Jiang H, Wang LL, Tang SQ, Sun YM, Ying BW, Jia YQ. A simple, fast correction method of triglyceride interference in blood hemoglobin automated measurement. *J. Clin. Lab. Anal.*, 27(5):341-345, 2013.
- Zhao CJ, Han GC, Qin YH, Wu Ch. Differentiating among horse (*Equus caballus*), donkey (*Equus asinus*) and their hybrids with combined analysis of nuclear and mitochondrial gene polymorphism. *J. Anim. Breed Genet.*, 122(4):285-288, 2005.
- Zinkl JG, Mae D, Guzman Merida P, Farver TB, Humble JA. Reference ranges and the influence of age and sex on hematologic and serum biochemical values in donkeys (*Equus asinus*). *Am. J. Vet. Res.*, 51:408-413, 1990.
- Zobra R, Ardu M, Niccolini S, Cubeddu F, Dimauro C. Physical, hematological, and biochemical responses to acute intense exercise in polo horses. *J. Equine Vet. Sci.*, 31(9):542-548, 2011.

