

TRABAJO FIN DE GRADO



APORTACIÓN DE LOS ÍNDICES HEMATOLÓGICOS AL SCREENING DE β TALASEMIA

Autor: Mario Lainez Escribano

Director: Jesús Fernando Escanero Marcén

Universidad de Zaragoza

Facultad de Medicina

Departamento de Fisiología y Farmacología

6º Curso; 2014-2015

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	5
I.1. Resumen en español.....	5
I.1.1. Introducción.....	5
I.1.2. Material y métodos.....	5
I.1.3. Resultados.....	5
I.1.4. Conclusión.....	5
I.2. Resumen en inglés.....	6
I.2.1. Introduction.....	6
I.2.2. Materials and methods.....	6
I.2.3. Results.....	6
I.1.4. Conclusion.....	6
I.3. Palabras clave.....	6
II. INTRODUCCION.....	7
II.1. Eritropoyesis y ciclo de los eritrocitos.....	7
II.1.1. Ciclo de vida del eritrocito y papel de la EPO.....	7
II.1.2. Metabolismo del hierro.....	9
II.1.2.1. Ciclo de reutilización del hierro.....	9
II.1.2.2. Regulación del metabolismo del hierro: la hepcidina.....	10
II.2. Desequilibrio del ciclo de eritropoyesis: Anemia.....	12
II.2.1. Anemia microcítica.....	13
II.3. Diagnóstico diferencial de anemias microcíticas.....	16
II.3.1. Desde los índices de Wintrobe hasta la actualidad.....	16
II.3.2. Diagnóstico actual de anemia microcítica y necesidad de nuevos parámetros.....	17

Índice.

II.4. OBJETIVOS.....	19
III. MATERIAL Y MÉTODOS	20
III.1. Bibliografía.....	20
III.1.1. Bases de datos.....	20
III.1.2. Palabras clave.....	20
III.1.3. Índices.....	20
III.1.4. Interpretación de resultados.....	20
III.2. Tecnología.....	21
IV. RESULTADOS.....	22
IV.1. Parámetros aportados por los distintos analizadores.....	22
IV.1.1. Siemens (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA).....	22
IV.1.2. Abbott (Abbott Diagnostics, Santa Clara, CA, USA).....	22
IV.1.3. Sysmex (Sysmex Corporation, Kobe, Japan).....	23
IV.1.4. Beckman Coulter (Beckman Coulter Inc. Miami, FL, USA).....	23
IV.2. Utilidad de los parámetros en el diagnóstico diferencial de anemia microcítica. Índices de microcitosis	24
IV.2.1 Diagnóstico avanzado y diferencial de anemia de proceso crónico y anemia por déficit de hierro.....	24
IV.2.2. Diagnóstico diferencial entre anemia ferropénica y β talasemia.....	25
IV.3. Cribado de β talasemia en casos de microcitosis.....	29
IV.4. Algoritmo para diagnóstico diferencial de microcitosis.....	30
V. DISCUSIÓN.....	32
VI. CONCLUSIONES.....	34
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	35

Índice.

VIII.ANEXOS. 43

VIII.1. Anexo I.	43
VIII.1.1. Principio Coulter.	43
VIII.1.2. Tecnología Siemens.....	44
VIII.1.3. Tecnología Abbot.	45
VIII.1.4. Tecnología Sysmex.....	46

I. RESUMEN.

I.1. RESUMEN EN ESPAÑOL.

I.1.1. Introducción.

La anemia microcítica puede deberse a dos causas, al déficit de hierro y a la talasemia. En muchos casos es difícil diferenciarlas por lo que es necesaria la utilización de índices que amplifiquen las diferencias existentes entre los parámetros de laboratorio arrojados por cada una de las patologías.

I.1.2. Material y métodos.

Mediante el estudio de la bibliografía relacionada con este tema se evalúan los nuevos analizadores de laboratorio (Sysmex, Siemens, Abbott y Beckman Coulter) y sus parámetros e índices correspondientes.

I.1.3. Resultados.

Los índices que se comparan son el clásico Green and King y los modernos M/H de Siemens y Abbott y el M-H y M-H-RDW de Sysmex. El M-H-RDW demuestra ser el más adecuado para diferenciar microcitosis (AUC 0.997). Para un punto de corte de -7.6 presenta una sensibilidad del 100% y una especificidad del 92,6%, situándose como el mejor índice para realizar "screening" de β talasemia. Posteriormente se debe medir la HbA₂ en estos pacientes para el diagnóstico definitivo.

I.1.4. Conclusión.

En casos de talasemia, la prevención es lo más importante para disminuir la morbilidad y mortalidad ya que el mayor peligro consiste en no diagnosticar a portadores y, consecuentemente, aumentar el riesgo de descendencia homocigota. Para evitarlo se propone el índice M-H-RDW como método de "screening" ya que, aparte de ser la prueba diagnóstica más útil, su aplicación es rápida, esta automatizada, no genera gastos adicionales y optimiza los recursos sanitarios limitando las mediciones de HbA₂ a las necesarias.

I.2. RESUMEN EN INGLÉS.

I.2.1. Introduction.

Microcytic anemia exists due to iron deficiency or a congenital disease known as thalassemia. Most of the clinical situations display similar parameter values so the application of indices that increase the differences between both illnesses are needed.

I.2.2. Materials and methods.

Studying the bibliography, new laboratory analyzers (Sysmex, Siemens, Abbott y Beckman Coulter) and their corresponding parameters and indices are evaluated.

I.2.3. Results.

The classical index Green and King as well as the modern M/H (Siemens and Abbott), M-H (Sysmex) and M-H-RDW (Sysmex) are compared. M-H-RDW index demonstrates to be the most appropriate diagnostic test to distinguish microcytic anemia (AUC 0.997). It displays as the best screening index with 100% of sensitivity and 92.6% of specificity (cutoff of -7.6). After classifying the patients, the measurement of HbA₂ is needed to diagnose them definitely.

I.1.4. Conclusion.

In thalassemia carriers, prevention is the most important in the overall management of the illness. The real danger of misdiagnosis is the potential homozygous offspring. M-H-RDW is proposed as a good screening test that diagnoses correctly, and optimizes the use of medical resources (measurement of HbA₂).

I.3. PALABRAS CLAVE.

Anemia microcítica; microcitosis; screening β talasemia; anemia ferropénica; diagnóstico diferencial; índices; analizadores.

II. INTRODUCCION

II.1. ERITROPOYESIS Y CICLO DE LOS ERITROCITOS

La hematopoyesis es el proceso a través del cual se producen los elementos formes de la sangre. Se inicia en las células madre pluripotenciales, de las que derivan a su vez las unidades de colonias linfoides, mieloides y eritroides.

La producción de células hematopoyéticas se encuentra reguladas estrechamente por un grupo de citoquinas hematopoyéticas: eritropoyetina (EPO) (1), factor estimulante de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF) (2), factor estimulante de las colonias granulocito (G-CSF) (3), interleuquina 3 (IL-3) e interleuquina 5 (IL-5) (4).

La eritropoyesis fetal puede ser identificada desde las 4-5 semanas de gestación, siendo el hígado el órgano primario responsable en los meses tercero a sexto de la gestación y, secundariamente, el bazo, timo y nódulos linfáticos. La eritropoyesis en médula ósea comienza alrededor del cuarto mes de gestación y va incrementándose a lo largo del desarrollo intrauterino (5). La eritropoyesis en el adulto tiene lugar en la médula ósea.

El eritrón es un órgano dinámico constituido por la reserva de precursores celulares eritroides de la médula ósea y la gran masa de eritrocitos circulantes. Para una óptima diferenciación y proliferación de la serie eritroide se requiere la IL-3 y el GM-CSF, junto a la acción de la EPO, siendo esta última hormona su principal estímulo (6).

II.1.1. Ciclo de vida del eritrocito y papel de la EPO.

La producción y liberación de EPO es regulada por el nivel de oxigenación hístico y se produce principalmente en los riñones, a nivel de las células peritubulares de la corteza interna y la médula externa (7). Una pequeña

Introducción.

cantidad se produce en el hígado a nivel de los fibroblastos intersticiales. Su vida media en la circulación es de 6 a 10 horas (8).

La EPO actúa mediante su unión a receptores específicos localizados en la superficie de los precursores eritroides de la médula, induciendo su proliferación y maduración. Bajo los estímulos de la misma, la producción de eritrocitos puede aumentar 4 a 5 veces durante un período de 1 a 2 semanas, pero sólo en presencia de los nutrientes adecuados, especialmente el hierro. Los precursores eritroides de la médula ósea crecen y se diferencian formando normoblastos. Cuando éstos expulsan su núcleo para formar eritrocitos, parte de los ribosomas permanecen aún en el citoplasma. Esta célula es el reticulocito.

Los restos ribosómicos característicos del reticulocito son reconocibles durante 4 días, 1-2 de ellos en la circulación sanguínea. Al cabo de ese tiempo desaparecen, dando lugar al eritrocito maduro. Estos tienen una vida media de 110 a 120 días, tras los cuales son eliminados de la circulación por macrófagos del sistema retículo-endotelial (SRE); éste incluye todas las células derivadas de los precursores monocíticos de la médula ósea (monoblasto y promonocito), los monocitos de la sangre periférica y los macrófagos o histiocitos de los distintos órganos y tejidos. Entre estos últimos cabe considerar los histiocitos del tejido conjuntivo, las células de Kupffer del hígado, las células de Langerhans de la epidermis, los osteoclastos del tejido óseo, la microglía del sistema nervioso central, los macrófagos alveolares del pulmón y los restantes macrófagos distribuidos por la médula ósea y el bazo. Es principalmente en el bazo donde la hemoglobina es degradada (9).

En estado de equilibrio la tasa de producción de eritrocitos debe igualar a la de destrucción, siendo eliminados aproximadamente cada día el 1%, que es reemplazado por un porcentaje similar de reticulocitos. Los reticulocitos permanecen en circulación 1-2 días, transcurridos los cuales pierden su red de ribosomas y se transforman en eritrocitos maduros (10).

Introducción.

Así pues los elementos críticos de la eritropoyesis son la producción de EPO, la capacidad proliferativa de la médula ósea, la disponibilidad de hierro y la maduración eficaz de los precursores eritrocitarios. En la maduración de los precursores eritrocitarios, además del estímulo hormonal producido por la EPO, son indispensables la vitamina B12, el ácido fólico, la vitamina B6 o piridoxina y el hierro (11).

II.1.2. Metabolismo del hierro.

En adultos sanos el hierro total del cuerpo es de 3,5-4,5 g, que se distribuye de la siguiente manera: el 60-70% se encuentra en la hemoglobina, el 3.5% está en los tejidos como mioglobina del músculo, el 0.5% está en las enzimas Hem (citocromos, citocromo oxidasa, peroxidasa, catalasa), el 0,1% está unido a transferrina en el plasma sanguíneo y alrededor del 30% en hombres y 16% en mujeres está depositado en hígado, bazo y médula ósea como ferritina y hemosiderina (12).

No existe una vía excretora del hierro y los únicos mecanismos de eliminación del organismo son la pérdida sanguínea (hemorragia digestiva, menstruación u otras formas de hemorragia) y la descamación de las células epidérmicas de la piel, el intestino y las vías genitourinarias. Dado que no existen mecanismos fisiológicos que regulen la pérdida de hierro, la homeostasis del mismo es dependiente de un mecanismo de retroalimentación entre las demandas del hierro del organismo y su absorción intestinal (13).

Así pues los principales factores responsables de la regulación de la tasa de absorción intestinal son la actividad eritropoyética de la médula ósea, la concentración de hemoglobina, el contenido de oxígeno de la sangre y la presencia o ausencia de citoquinas inflamatorias (14).

II.1.2.1. Ciclo de reutilización del hierro.

En el metabolismo del hierro es fundamental la conservación con vistas a su reutilización. La mayor parte del hierro se emplea en la síntesis de hemoglobina por el eritrón en la médula ósea. El complejo hierro-transferrina circula en el

Introducción.

plasma hasta que este complejo interacciona con receptores de transferrina específicos situados en la superficie de las células eritroides (la célula que más receptores posee es el eritroblasto en desarrollo) (15).

Una vez producida la interacción, el complejo se interioriza y se transporta a un endosoma ácido donde el hierro es liberado. Este se hace accesible para la síntesis del hemo mientras que el complejo transferrina-receptor se recicla hacia la superficie de la célula, donde la inmensa mayoría de la transferrina se vuelve a liberar hacia la circulación y el receptor se ancla de nuevo en la membrana. Es posible que una pequeña cantidad de la proteína del receptor de transferrina pase a circulación, midiéndose en forma de receptor soluble de la transferrina (16).

En el interior de la célula eritroide, el hierro que excede la cantidad necesaria para la síntesis de hemoglobina se une a una proteína de almacenamiento, la apoferritina, para formar la ferritina. El mecanismo de intercambio de hierro tiene lugar no solo en los precursores eritroides, sino también en otras células del cuerpo que expresan receptores para la transferrina, especialmente las células parenquimatosas hepáticas, en las que el hierro se puede incorporar a las enzimas que contienen hemo o almacenarse. Los glóbulos rojos senescentes son fagocitados por los macrófagos del SER y el hierro contenido en la hemoglobina se “recicla”: la misma proteína presente en el duodeno, la ferroportina, es la encargada de exportar el hierro de los macrófagos (17).

II.1.2.2. Regulación del metabolismo del hierro: la hepcidina.

En los últimos 12 años, ha avanzado sustancialmente el conocimiento sobre la homeostasis del hierro. Como resultado, una pequeña hormona peptídica, la hepcidina, ha surgido como principal regulador de la absorción de hierro, sus niveles plasmáticos y su distribución.

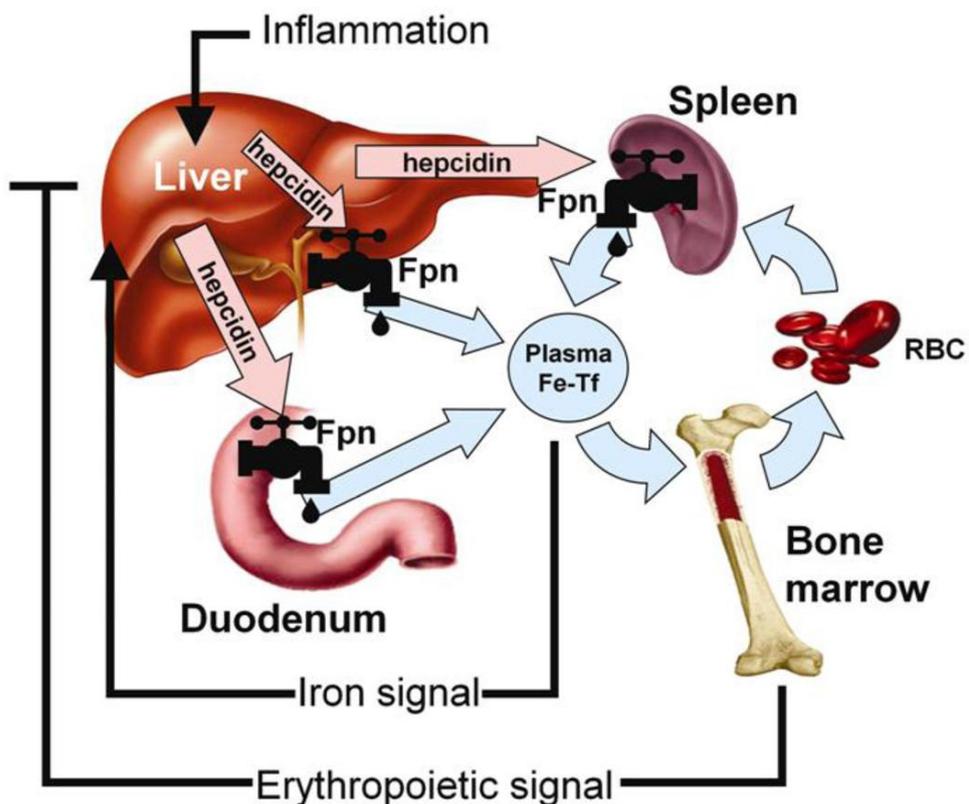
Cada uno de los factores antes mencionados que regulan la absorción intestinal de hierro (actividad eritropoyética de la médula ósea, concentración

Introducción.

de hemoglobina, contenido de oxígeno de la sangre y presencia o ausencia de citoquinas inflamatorias) regulan la expresión de hepcidina en el hígado (18).

Cuando uno de estos factores sufre una modificación, la absorción intestinal de hierro varía en relación inversa a la expresión hepática de hepcidina (19). La hepcidina reduce la actividad funcional de la ferroportina, mediante unión directa, causando su internalización de la superficie celular y degradación (20). En el enterocito disminuye la transferencia a través de la membrana basolateral y, por lo tanto, su absorción; en el macrófago y el hepatocito la acción de la hepcidina provoca un descenso de la exportación de hierro y, por tanto, un aumento de hierro almacenado.

Figura 1. Esquema de funcionamiento de la hepcidina.



¹ Fpn, ferroportina-1; Fe-TF, hierro circulante ligado a transferrina (65).

II.2. DESEQUILIBRIO DEL CICLO DE ERITROPOYESIS: ANEMIA.

La capacidad funcional del eritrón requiere una producción renal normal de EPO, una médula eritroide funcional y un aporte apropiado de los sustratos necesarios para la síntesis de hemoglobina. Un defecto en cualquiera de estos componentes clave puede dar lugar a anemia (10).

Las anemias pueden clasificarse teniendo en cuenta diversos aspectos. El recuento de reticulocitos es clave para la clasificación etiopatogénica de la enfermedad. Según este criterio las anemias se dividen en regenerativas y arregenerativas (21).

En las anemias regenerativas o periféricas la médula ósea conserva o tiene aumentada su capacidad de producción, lo que ocurre cuando hay pérdidas en forma de hemorragia aguda (hemorragias, grandes pérdidas menstruales en las mujeres, etc.) o un aumento de la destrucción eritrocitaria (anemias hemolíticas).

Las anemias arregenerativas o centrales se caracterizan por que la médula ósea es incapaz de mantener la producción eritrocitaria de forma adecuada, ya sea por defecto de la propia médula o por falta de los factores necesarios para la eritropoyesis, fundamentalmente por déficit de hierro o de vitaminas o una dificultad en la utilización de los mismos, como ocurre en las enfermedades de larga evolución.

La clasificación morfológica divide a las anemias según el valor de los parámetros MCV (volumen corpuscular medio) y MCHC (concentración corpuscular media de hemoglobina) (22).

Atendiendo al MCV pueden ser microcíticas < 80 fL, normocíticas 80-98 fL o macrocíticas > 98 fL. Según la concentración de hemoglobina del hematíe se clasifican en hipocrómicas < 28 g/dL, normocrómicas 28-38 g/dL o hipercrómicas >38 g/dL. Este estudio se focaliza en las anemias microcíticas por lo que se omite la introducción a las anemias normocíticas y macrocíticas.

II.2.1. Anemia microcítica

La OMS (Organización Mundial de la Salud) estima que 2000 millones de personas se ven afectadas de anemia, siendo el 50% producidas por déficit de hierro. (23)

Anemia ferropénica

La deficiencia de hierro es la causa más común de anemia microcítica. La evolución hasta llegar a ella se divide en tres fases. La primera es de balance negativo de hierro, en el cual las necesidades (o pérdidas) del metal rebasan la capacidad del organismo para absorber hierro de los alimentos. Esta primera etapa es consecuencia de diversos mecanismos fisiológicos asociados a una alta demanda (embarazo, crecimiento, adolescencia), una ingesta inadecuada o pérdida hemática.

Este déficit debe ser compensado por la movilización de hierro de sus depósitos en el SER o hepáticos. Así disminuyen las reservas de hierro, lo que se refleja en los niveles de ferritina; mientras existan depósitos la sideremia, la saturación de transferrina y los índices eritrocitarios se mantienen normales.

La segunda fase es el agotamiento de las reservas y, en consecuencia, se produce la eritropoyesis ferropénica. La ferritina y la saturación de transferrina están disminuídas así como los índices eritrocitarios; en el frotis de sangre periférica aparecen microcitos y células hipocrómicas. La concentración de receptor soluble de transferrina en suero se eleva. Al producirse la disminución de hemoglobina la anemia ferropénica (IDA) queda instaurada (10).

La prueba definitiva para IDA es la medida de la ferritina sérica. Un descenso de ferritina en suero es diagnóstico de un estado de depleción del hierro (24), aunque el nivel de ferritina del suero puede ser elevado en la presencia de la reacción de fase aguda.

La anemia asociada a enfermedad crónica (ACD) es generalmente normocítica. Sin embargo, algunas enfermedades sistémicas (artritis

Introducción.

reumatoide, polimialgia reumática, diabetes mellitus, linfoma de Hodgkin, mielofibrosis) puede ser acompañadas por anemia microcítica. La concentración de hierro sérico y la saturación de transferrina no distinguen exactamente IDA de ACD y, por lo tanto, su valor es limitado en la evaluación de la anemia microcítica.

El receptor soluble de transferrina resulta ser la medida de laboratorio con mejor rendimiento diagnóstico a la hora de diferenciar ambas anemias (25). Como la mayoría de los receptores tisulares de transferrina se localizan en los precursores eritroides, el nivel de receptores solubles medido en el suero es directamente proporcional a la actividad eritropoyética (26).

Los niveles altos de receptor soluble de transferrina son característicos de la deficiencia de hierro independientemente de si hay enfermedad crónica o no. En contraste, los niveles séricos de estos receptores no se afectan en pacientes con anemia de los procesos crónicos no deficientes de hierro (27).

Si los parámetros bioquímicos del metabolismo del hierro tienen valores dentro de los rangos de referencia, el paso siguiente, dentro de la valoración de la anemia microcítica es considerar el diagnóstico de talasemia.

Talasemia

La talasemia se considera la alteración genética más común del mundo. Aproximadamente el 1,7% de la población mundial es portadora de alguna de las mutaciones (28). Son particularmente prevalentes en el área del Mediterráneo (8%), Oriente Medio (10%), India (3-15%), y Sudeste asiático (9%), donde representa un importante problema de salud pública (29).

Sin embargo, los cambios en la población surgidos de las distintas migraciones de minorías étnicas con alta frecuencia de mutaciones talasémicas hacen que su distribución a lo largo de todo el mundo esté cambiando y que países no endémicos como los del Norte de Europa y Norte América también se encuentren con los problemas relacionados con la talasemia (30). Datos de recientes informes epidemiológicos indican que en Europa 15000 personas

Introducción.

aproximadamente son pacientes con talasemia dependientes de transfusiones (31).

La talasemia se define como una hemoglobinopatía asociada con la producción disminuida de cualquiera de las cadenas de globina (α talasemia o β talasemia). Resultado del desequilibrio de la producción de las cadenas de globina es la microcitosis, un valor de HbA2 alterado, al igual que el patrón normal de la electroforesis de hemoglobinas. El diagnóstico se confirma con pruebas genéticas (32).

α Talasemia

La producción de las cadenas α de globina es controlada por 4 genes. La mutación de los 4 genes es incompatible con la vida (hydrops fetalis). La mutación de 3 de los genes permite al exceso de cadenas β formar tetrámeros (hemoglobina H) y da como resultado una anemia severa y microcitosis. En el rasgo α talasémico la mutación de 2 genes origina microcitosis y anemia leve, mientras que la mutación solamente de 1 de los genes no causa ni anemia ni microcitosis (portador silente).

La electroforesis de hemoglobinas es normal en el rasgo talasémico y anormal en la enfermedad de la hemoglobina H; la concentración de HbA2 está disminuida. Las pruebas genéticas pueden revelar el defecto molecular subyacente; los más habituales son las deleciones 3.7 y 4.2 (33).

β Talasemia

Los síndromes β talasémicos resultan de la sustitución o deleción de uno o más nucleótidos. El resultado de las mutaciones es una disminución de la producción del ARN mensajero con el consiguiente descenso en la síntesis normal de la globina (34).

La producción de cadena β de globina es controlada por 2 genes. La β talasemia puede presentarse como rasgo menor (1 mutación) o como enfermedad sintomática o mayor (mutación de ambos genes). En el rasgo

Introducción.

talasémico, el nivel de la hemoglobina A2 ($\alpha_2\delta_2$) puede aumentar por encima del valor normal (3,0 – 3,5 %), hasta una concentración de 8%. Sin embargo, si la deficiencia del hierro coexiste, el aumento previsto en hemoglobina A2 no puede ocurrir (35).

Por lo tanto, un nivel normal de HbA2 no excluye la posibilidad de rasgo talasémico, a menos que se documente simultáneamente una ferritina sérica normal. En la talasemia mayor la electroforesis de hemoglobinas revela la hemoglobina F ($\alpha_2\gamma_2$) elevada. Un aumento leve o moderado en la Hb F puede también encontrarse en el rasgo talasémico. Por lo tanto, generalmente la separación y cuantificación por electroforesis o cromatografía de las hemoglobinas es a menudo adecuado para evaluar una β talasemia, y la prueba genética puede ser innecesaria (36).

II.3. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE ANEMIAS MICROCÍTICAS.

II.3.1. Desde los índices de Wintrobe hasta la actualidad.

Los trabajos pioneros de laboratorio clínico (1934) de Maxwell Myer Wintrobe fueron una gran aportación a la medicina, ya que permitieron el diagnóstico y clasificación de anemia. A través de la medida manual de Hb, hematocrito y recuento eritrocitario calculó una serie de índices que llevan su nombre: volumen corpuscular medio (MCV), concentración media de Hb corpuscular (MCHC) y Hb corpuscular media (MCH).

Posteriormente, en 1940, Wallace H. Coulter desarrolló una tecnología para contar y medir partículas a través de medidas de impedancia de las mismas. Mediante el “principio de Coulter” se miden los cambios en la conductancia eléctrica de las células suspendidas en un líquido conductor que pasan a través de un diminuto orificio. De esta forma, nació la automatización de los recuentos de hematíes.

En 1990 los analizadores fueron capaces de cuantificar la heterogenicidad de la distribución del MCV, desarrollando así una nueva medida, la amplitud de distribución eritrocitaria (RDW).

Introducción.

Actualmente el método de análisis más utilizado es la citometría de flujo. A través de un haz laser monocromático se evalúa la difracción de cada hematíe, que varía según el tamaño y el índice de refracción (depende de las estructuras internas). Gracias a esta tecnología podemos calcular concentración de Hb (CHC) y volumen corpuscular de células individuales, desarrollando así cuatro nuevos parámetros hematológicos, los parámetros extendidos. Así pues distinguimos entre células hipocrómicas con CHC <280 g/L, hiperocrómicas con CHC >410 g/L, células microcíticas con volumen <60 fL y macrocíticas cuyo volumen es >120 fL (37).

Los contadores más modernos nos permiten también conocer información de los reticulocitos, tanto su recuento, como sus características de tamaño y contenido de Hb (18).

De esta manera, la citometría de flujo nos aporta información de cómo se distribuye la Hb en células individuales (frente a los índices clásicos que solo informaban del valor medio de Hb). Clínicamente nos permite saber las fluctuaciones de la disponibilidad de Fe durante las últimas semanas en el eritrón (análisis de eritrocitos maduros) y la actividad eritropoyética del eritrón en el momento actual (análisis de los reticulocitos) (18, 37).

Los primeros analizadores en ofrecer parámetros extendidos fueron los Advia (Bayer Diagnostics, actualmente Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA) y posteriormente Abbott (Abbott Diagnostics, Santa Clara, CA, USA) y Sysmex (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) (37).

II.3.2. Diagnóstico actual de anemia microcítica y necesidad de nuevos parámetros.

El diagnóstico de laboratorio de déficit de Fe se realiza midiendo los siguientes parámetros: disminución del MCV, disminución de la HCM, disminución de RBC, déficit de Fe sérico, disminución de % de saturación de transferrina y disminución de la ferritina (38). Por otro lado, la sospecha de β -

Introducción.

talasemia consiste en un perfil hematológico con eritrocitosis y microcitosis (39) y un diagnóstico definitivo mediante la concentración de HbA₂ (40).

Sin embargo, actualmente estos datos pueden no diagnosticar correctamente ya que:

- Conforme disminuye el Fe disponible para la eritropoyesis, la síntesis de moléculas de Hb se ve disminuida, lo que se refleja como una producción de eritrocitos hipocrómicos. Debido a que su vida media es de 3 meses, se juntaran diferentes poblaciones de eritrocitos: normocrómicos y progresivamente más hipocrómicos. Esto se refleja también en el tamaño eritrocitario, de forma que la RDW (Amplitud de Distribución Eritrocitaria) se ve alterada. No obstante, con la analítica clásica no se es capaz de discernir el contenido de Hb de los hematíes, solo se pueden calcular valores medios (la HCM se calcula con el recuento total de hematíes y la Hb total). De esta manera las células con valores extremos de Hb (tanto hiperocrómicas como hipocrómicas) no se ven reflejadas en la analítica básica, haciendo imposible el conocimiento de las fluctuaciones del Fe disponible en las últimas semanas.
- Situaciones de inflamación inducen sobreproducción de hepcidina por mediación de citoquinas. Esto se traduce en una disminución de Fe circulante debido al secuestro de Fe en los lugares de almacén (SRE, macrófagos tisulares). Esta situación es conocida como déficit funcional de Fe (no hay déficit global ya que el contenido total corpóreo de Fe es normal) y conlleva una limitación del Fe disponible para la eritropoyesis. Generalmente la anemia resultante no es severa (41).
- El Fe sérico sufre amplias variaciones fisiológicas a lo largo del día y asimismo la saturación de transferrina, la cual también se ve disminuida en situaciones de inflamación (42, 43).
- La ferritina es un reactante de fase aguda de forma que los niveles pueden estar elevados en situaciones de inflamación crónica, infección, enfermedad maligna o daño hepático (44).

Introducción.

- En la práctica clínica los perfiles típicos de laboratorio de anemia microcítica muchas veces no cumplen todos los criterios, y muestran parámetros solapados. Esto ocurre sobre todo en anemia leve y moderada mientras que los casos con Hb < 9.0 g/dL no plantean dudas diagnósticas (39). Por otro lado, se puede encontrar en un mismo paciente anemia ferropénica y talasemia, pudiendo pasar por alto uno de los diagnósticos al interpretar los parámetros.

II.4. OBJETIVOS.

Los parámetros que aporta el laboratorio de Hematología y Bioquímica Clínica al estudio avanzado de las anemias dependen de la tecnología elegida. En este estudio se busca seleccionar el índice que aporte la mejor información objetiva, numérica y con potencial utilidad clínica para diferenciar anemia ferropénica y β talasemia.

El objetivo principal consiste en seleccionar los parámetros e índices que mejor diferencien las distintas entidades microcíticas: anemia por déficit de hierro y β talasemia.

Para ello se proponen los siguientes objetivos secundarios:

1. *Recopilar* los parámetros aportados por diversos analizadores en relación a su utilidad para el diagnóstico de anemias.
2. *Evaluar* los índices derivados de dichos parámetros respecto a su capacidad de diferenciar anemia talasémica de no talasémica.
3. *Establecer* el índice que debute como mejor prueba de “screening” de β talasemia, en casos de microcitosis, como paso previo a la realización de pruebas diagnósticas definitivas.
4. *Proponer* un algoritmo diagnóstico útil en la práctica clínica diaria que guíe el proceso de manejo de microcitosis.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

En este apartado se va a proceder en primer lugar a describir las bases de la bibliografía utilizada. En segundo lugar se resumirán las bases tecnológicas de los modernos analizadores de Laboratorio Clínico con potencial utilidad en el diagnóstico diferencial de anemia microcítica.

III.1. BIBLIOGRAFÍA.

III.1.1. Bases de datos.

Los artículos usados en la creación del presente trabajo han sido obtenidos de la base de datos PubMed y de la Universidad de Zaragoza.

III.1.2. Palabras clave.

Las siguientes palabras clave han sido utilizadas para la búsqueda de información. Microcytic anemia; Microcytosis; β -thalassemia screening; Differential diagnosis; Thalassemia; Iron deficiency anemia; Erythrocyte indices; Haematology analysers.

III.1.3. Índices.

Dada la muy distinta patología subyacente, los valores de los parámetros de la serie roja presentan sutiles diferencias en los diversos tipos de anemia. Los índices son formulas matemáticas que intentan incrementar las diferencias observadas de los parámetros individuales en ambas anemias. En el presente estudio se han buscado, en las diferentes referencias bibliográficas, índices para diferenciar mejor los tipos de microcitosis.

III.1.4. Interpretación de resultados.

La bibliografía estudiada arroja datos estadísticos para los cuales hay que comprender las bases de los mismos.

- $$\text{Sensibilidad \%} = \frac{\text{positivos verdaderos}}{\text{positivos verdaderos} + \text{falsos negativos}} * 100 =$$
$$\frac{\text{positivos verdaderos}}{\text{todos los enfermos}} * 100$$

Material y métodos.

- $$\text{Especificidad \%} = \frac{\text{negativos verdaderos}}{\text{negativos verdaderos} + \text{falsos positivos}} * 100 = \frac{\text{negativos verdaderos}}{\text{todos los sanos}} * 100$$
- $$\% \text{ falsos positivos} = \frac{\text{sanos positivos}}{\text{sanos negativos} + \text{sanos positivos}} * 100$$
- $$\% \text{ falsos negativos} = \frac{\text{enfermos negativos}}{\text{enfermos negativos} + \text{enfermos positivos}} * 100$$
- $$\text{Índice de Youden} = (\text{sensibilidad} + \text{especificidad}) - 100$$
- AUC: tiene en cuenta los valores de sensibilidad, especificidad, FP y FN y los representa en forma de gráfico para comparar los valores de diferentes test. Las técnicas diagnósticas con valores cercanos a 1 tienen los mejores datos de sensibilidad y especificidad (45).

Estas son las herramientas que se van a utilizar para evaluar la validez de los índices estudiados.

III.2. TECNOLOGÍA.

A parte de los parámetros clásicos de laboratorio que se pueden obtener en cualquier analizador moderno, en este estudio se recopilan los parámetros aportados por los analizadores Siemens (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA), Abbott (Abbott Diagnostics, Santa Clara, CA, USA), Sysmex (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) y Beckman Coulter (Beckman Coulter Inc. Miami, FL, USA). En el Anexo I, se profundiza en las bases tecnológicas de cada uno.

Resultados.

IV. RESULTADOS.

Se va a proceder presentando los resultados encontrados que en concordancia con los objetivos del estudio.

IV.1. PARÁMETROS APORTADOS POR LOS DISTINTOS ANALIZADORES.

IV.1.1. Siemens (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA).

A partir de este analizador se pueden obtener los siguientes parámetros:

- %Hypo (%): Se refiere al porcentaje de eritrocitos maduros hipocromos (concentración de Hb < 280 g/L). %Hypo < 5% se considera normal, mientras que valores %Hypo > 10% indican déficit de Fe (18).
- %Hyper (%): Informa del porcentaje de eritrocitos maduros hiperocrómicos (concentración de Hb 410 g/L) (46).
- CHr (pg): Se refiere al contenido de Hb de los reticulocitos. Valores < 28-29 pg indican déficit de Fe disponible para la eritropoyesis (18).
- %Macro (%): Marca el porcentaje de RBC macrocíticos (con volumen > 120fL).
- %Micro (%): Indica el porcentaje de RBC microcíticos (volumen < 60fL) (46).

IV.1.2. Abbott (Abbott Diagnostics, Santa Clara, CA, USA).

El analizador CELL-DYN Sapphire de Abbott permite calcular el volumen y concentración de Hb de células individuales del sujeto, definiendo los siguientes índices:

Resultados.

- %HPO (%): Se refiere al porcentaje de eritrocitos hipocrómicos (concentración celular de Hb < 280 g/L). Los valores de referencia son 0 - 4.8%.
- %HPR (%): Porcentaje de eritrocitos hiperocrómicos (concentración celular de Hb > 410 g/L).
- MCHr (pg): El contenido celular medio de Hb en el reticulocito es normal entre los valores 28,5 y 34,5 pg.
- %MIC (%): Porcentaje de eritrocitos microcíticos (volumen < 60fL).
- %MAC (%): Porcentaje de eritrocitos macrocíticos (volumen > 120fL).

IV.1.3. Sysmex (Sysmex Corporation, Kobe, Japan).

Sysmex nos ofrece los siguientes parámetros.

- %Hypo-He: Porcentaje de eritrocitos hipocrómicos (contenido de Hb < 17pg).
- %Hyper-He: Porcentaje de eritrocitos hiperocrómicos (contenido de Hb >
- Ret He: Se refiere al contenido de Hb del reticulocito. Valores < 29 pg indican eritropoyesis ineficaz.
- %Micro R: Porcentaje de eritrocitos microcíticos (volumen < 75 fL).
- %Macro R: Porcentaje de eritrocitos macrocíticos (volumen > 200fL) (18).

IV.1.4. Beckman Coulter (Beckman Coulter Inc. Miami, FL, USA)

Beckman Coulter aporta dos índices.

- LHD%: El porcentaje de Hb de baja densidad deriva del parámetro tradicional MCHC y evalúa la disponibilidad de Fe para

Resultados.

eritropoyesis y el contenido de Hb de las células maduras. Valores > 6.0% sugieren déficit de Fe (18).

$$LHD\% = 100 * \sqrt{1 - \left(\frac{1}{1 + e^{1.8(30-MCHC)}}\right)}$$

- RSf: El “Red Blood cells Size factor” relaciona los volúmenes de eritrocitos y reticulocitos, directamente asociados a la disponibilidad de hierro y la hemoglobinización (47).

$$RSf = \sqrt{MCV * MRV}$$

IV.2. UTILIDAD DE LOS PARÁMETROS EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE ANEMIA MICROCÍTICA. ÍNDICES DE MICROCITOSIS

Los parámetros arrojados por los analizadores citados tienen dos utilidades principales: el diagnóstico avanzado y diferencial entre anemia de proceso crónico y anemia por déficit de hierro, y el diagnóstico diferencial de anemia ferropénica y β talasemia.

IV.2.1 Diagnóstico avanzado y diferencial de anemia de proceso crónico y anemia por déficit de hierro.

Aunque el presente estudio se centra en el diagnóstico diferencial de anemia ferropénica y β talasemia, a continuación se cita brevemente las principales utilidades de estos analizadores en el diagnóstico avanzado de anemias.

El índice LHD% (B. Coulter) presenta una buena correlación con %Hypo (Siemens), %Hypo-He (Sysmex) y %HPO (Abbott). La utilidad de todos ellos es la capacidad de evaluar el hierro disponible para eritropoyesis en las semanas previas con buen rendimiento diagnóstico. Una de las principales ventajas es que sus valores no se ven influenciados por la inflamación y por lo tanto son

Resultados.

útiles para el diagnóstico de anemia de proceso crónico y ajustes en su tratamiento con eritropoyetina humana recombinante (rHuEpo) (18).

Por otro lado el parámetro CHr (Siemens), Ret He (Sysmex), RSf (B. Coulter), MCHr (Abbott) y RSf (B. Coulter) presentan, así mismo, el mismo significado clínico. Permiten detectar una eritropoyesis ineficiente en el momento actual (en los dos días previos). Esto es útil para el diagnóstico de depleción de reservas de hierro cuando todavía no se manifiesta con un descenso de Hb, para la monitorización de la respuesta al tratamiento con rHuEpo y para sospechar de la presencia de procesos de gran virulencia que condicionan la activación de mecanismos de inmunidad con su correspondiente eritropoyesis ineficaz (48, 18).

Aunque los valores de los distintos analizadores automáticos se corresponden en cuanto a significado clínico, las diferencias tecnológicas hacen que sea necesario establecer valores de referencia específicos e independientes para cada uno (18).

IV.2.2. Diagnóstico diferencial entre anemia ferropénica y β talasemia.

El diagnóstico diferencial de microcitosis talasémica y no talasémica tiene gran importancia clínica, dada su diferente etiología, patogénesis y tratamiento. Así, con el fin de ayudar en esta discriminación, se han propuesto varios índices para distinguir la anemia ferropénica del rasgo talasémico (49).

Dada la muy distinta patología subyacente, los valores de los parámetros de la serie roja presentan sutiles diferencias en ambos tipos de anemia. Los índices son fórmulas matemáticas que intentan incrementar las diferencias observadas de los parámetros individuales en ambas anemias.

Mediante estos índices se pretende seleccionar pacientes con alta probabilidad de ser portadores de β talasemia. Posteriormente, deben ser sometidos a la medición HbA₂ para confirmar el diagnóstico.

Resultados.

Parámetros clásicos de diagnóstico de anemia.

Desde 1970 se ha desarrollado el interés en índices que procuren un acercamiento al diagnóstico diferencial de microcitosis. Aunque en el presente estudio se ha hecho hincapié en los útiles parámetros de los nuevos analizadores (profundizan más en las características de las células sanguíneas), hay que tener en cuenta los previamente existentes a partir de los parámetros clásicos de laboratorio. Estos datos son aportados por todos los analizadores actuales.

La siguiente tabla muestra los distintos índices, sus fórmulas y puntos de corte.

Tabla 1. Índices de los parámetros clásicos de laboratorio.

Índices	Fórmula	IDA	Talasemia
Ehsani et al (50)	$E = MCV - (10 * RBC)$	>15	<15
England et al (51)	$E\&F = MCV - RBC - 5 * Hb - 3.4$	>0	<0
Green and King (52)	$G\&K = \frac{[MCV]^2 * RDW}{100 * Hb}$	>65	<65
Mentzer (53)	$M = MCV/RBC$	>13	<13
Ricerca et al (54)	$R = RDW/RBC$	>4.4	<4.4
Shine and Lal (55)	$S\&L = MCV^2 * MCH * 0.01$	>1530	<1530
Sirdah et al (56)	$Si = MCV - RBC - 3 * Hb$	>27	<27
Srivastava and Bevington (57)	$S = \frac{MCH}{RBC}$	>3.8	<3.8

Resultados.

Tabla 2. Rendimiento diagnóstico de los índices clásicos.

Índices	AUC	Sensibilidad(%)	Especificidad(%)	Índice de Youden(%)
Ehsani et al (50)	0.961	87.2	89.9	77.1
England et al (51)	0.975	78.6	98.4	77.0
Green and King (52)	0.991	91.0	99.1	90.1
Mentzer (53)	0.958	94.3	84.2	78.5
Ricerca et al (54)	0.976	100	13.7	13.7
Shine and Lal (55)	0.887	100	13.3	13.3
Sirdah et al (56)	0.978	81.3	97.9	79.2
Srivastava and Bevington (57)	0.924	70.8	91.3	62.1

Abbott (Abbott Diagnostics, Santa Clara, CA, USA).

Uno de los índices más simples y a la vez más importantes es el M/H ratio (microcytic to hypochromic RBC). Se basa en que los eritrocitos son generalmente más hipocrómicos y menos microcíticos en déficit de hierro que en β talasemia (58).

$$M/H \text{ ratio} = MIC/HPO$$

Con un punto de corte óptimo en 6.4, se consigue una sensibilidad del 96.4% y una especificidad del 85.1% con un AUC (Área Bajo la Curva) de 0.948.

Resultados.

Tabla 3. A modo de ejemplo se presenta esta tabla con puntos de corte e índices de Youden.

Punto de corte	Sensibilidad (%)	Especificidad(%)	Índice Youden(%)
1.5	100	14.0	14.0
1.6	98.8	14.5	13.3
5.2	98.2	77.2	76.0
5.3	97.5	78.2	75.7
5.5	97.5	80.4	77.9
5.7	96.3	81.0	77.3
5.9	96.3	81.7	78.0
6.3	96.3	82.3	78.6
6.4	96.4	85.1	81.5
6.5	96.5	84.3	80.8
6.6	93.8	84.3	78.1

Cabe destacar que este índice tiene utilidad para detectar β talasemia en pacientes que la presentan en concomitancia con ferropenia. Por el contrario, este índice no tiene tanta utilidad a la hora de identificar a pacientes con α talasemia ya que en muchas ocasiones no presentan microcitosis (59).

Siemens (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA).

Debido a la similitud en el significado clínico entre parámetros del analizador Siemens y Abbott, el M/H ratio puede calcularse al igual que en el CELL-DYN Sapphire.

$$M/H \text{ ratio} = \%Micro/\%Hypo$$

Con un punto de corte óptimo en 3.7, se aprecia una sensibilidad del 99,2%, una especificidad del 77.1% y un AUC de 0.943 (60).

Resultados.

Sysmex (Sysmex Corporation, Kobe, Japan).

Sysmex crea un índice en base al porcentaje de eritrocitos microcíticos y de eritrocitos hipocrómicos.

$$M - H = \% \text{ MicroR} - \% \text{ HypoHe}$$

El punto de corte con mayor índice de Youden es 11.5, con una sensibilidad de 97.4%, una especificidad de 96.0% y un AUC de 0.994.

Bajo la premisa de que el RDW esta aumentado en IDA y en β talasemia pero con valores superiores en la primera, se añade a la fórmula previa el RDW.

$$M - H - RDW = \% \text{ MicroR} - \% \text{ HypoHe} - RDW$$

Con este índice y un punto de corte de -5.1 (índice de Youden máximo) se obtiene una sensibilidad de 98.1%, una especificidad de 97.1% y AUC de 0.997. Además si toma como punto de corte -7.6, la sensibilidad pasa a ser del 100% con una especificidad de 92.6% (61).

IV.3. CRIBADO DE B TALASEMIA EN CASOS DE MICROCITOSIS.

Un índice adecuado para realizar “screening” en pacientes debe tener una sensibilidad tan alta como sea posible para detectar al máximo número de portadores de la enfermedad y evitar falsos negativos (FN). Por otro lado la especificidad debe ser lo suficientemente buena para evitar someter a la medición de HbA₂ a sujetos a los que no se les debería realizar más análisis (falsos positivos [FP]) (62).

El índice M-H-RDW (Sysmex) ha demostrado los mejores resultados. Con un punto de corte de -7.6 demuestra una sensibilidad del 100% y especificidad del 92.6%, permitiendo la detección de todos los casos de β talasemia. Aunque el 7.4% serán falsos positivos, la medición de HbA₂ los clasificará correctamente como no talasémicos.

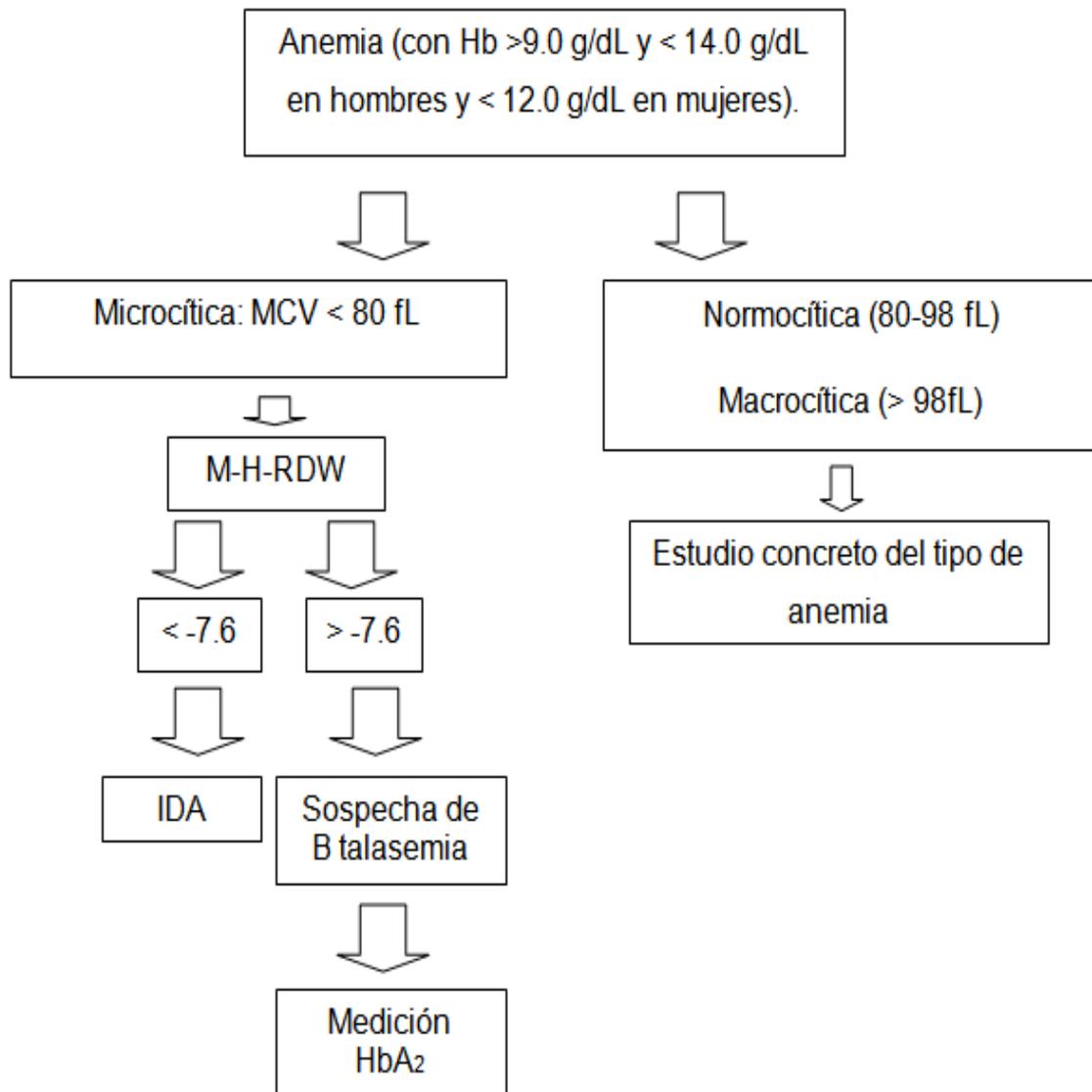
IV.4. ALGORITMO PARA DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE MICROCITOSIS.

Tomando el índice M-H-RDW se propone el siguiente algoritmo diagnóstico como esquema para el diagnóstico diferencial de microcitosis en la práctica clínica.

1. *Sospecha de anemia microcítica*: El hemograma nos orienta hacia el posible origen de la anemia. Un RBC por encima de los valores normales orienta a talasemia y cifras por debajo indican IDA. Las cifras de MCH y MCHC suelen ser menores en IDA que en talasemia, el MCV tiende a ser menor en talasemia y el RDW mayor en IDA. Sin embargo se ha demostrado que los rangos de los parámetros (RBC, Hb, MCV, MCH, MCHC y RDW) para ambas patologías se solapan en casos de anemia leve y media (anemia con Hb <9.0 g/dL no plantea dudas). Además los datos clásicos del metabolismo del hierro que podrían apoyar la hipótesis de IDA aportan información no fiable en numerosas circunstancias. En definitiva, se necesitan más herramientas y más fiables para diagnosticar correctamente.
2. *Diagnóstico diferencial de microcitosis*: El M-H-RDW surge como el recurso más útil para clasificar correctamente a los pacientes. Con valores > -7.6 hay que sospechar β talasemia y profundizar en su estudio.
3. *Diagnóstico definitivo de β talasemia*: Elevación de HbA₂. Para asegurarnos de que los valores de HbA₂ son correctos, debemos descartar que haya un déficit de Fe.

Resultados.

Figura 2. Algoritmo diagnóstico en casos de microcitosis.



2

² Hb, hemoglobina; MCV, volumen corpuscular medio; *M - H - RDW*, = % *MicroR - % HypoHe - RDW*; IDA, anemia por déficit de hierro.

V. DISCUSIÓN.

Los pacientes con β talasemia tienen un alto índice de microcitosis (debido al déficit de la síntesis de globina), como resultado del aumento crónico de la eritropoyesis que es ineficiente (63). Por otro lado, la eritropoyesis deficiente de hierro está caracterizada por la producción de eritrocitos con un contenido de Hb disminuido, así que un alto porcentaje de células hipocrómicas está presente (64). A medida que la anemia ferropénica se hace más severa el número de los microcitos aumenta.

El diagnóstico diferencial de microcitosis talasémica y no talasémica tiene gran importancia clínica, dada su diferente etiología, patogénesis y tratamiento. En el caso de talasemia, la prevención es importante para el control global de la enfermedad ya que el peligro real de no diagnosticar a estos pacientes lo constituye el riesgo potencial de una descendencia homocigota. Un “screening” apropiado, la detección de los portadores y el consejo genético a las parejas en riesgo son los procedimientos más importantes para el control de la enfermedad (62, 49).

Para realizar un “screening”, el índice discriminante debe tener un alto nivel de sensibilidad y especificidad para así detectar el máximo número de pacientes talasémicos mientras que elimina tantos no talasémicos como sea posible. Posteriormente hace falta cuantificar los niveles de HbA₂ para diagnosticar la enfermedad definitivamente. En anemia severa los resultados de esta cuantificación podrían ser incorrectos por lo que el paciente anémico sospechoso debe ser tratado y evaluado de nuevo después de la recuperación de la anemia severa (35).

Con el objetivo de cribado se han propuesto una serie de índices obtenidos a partir de los parámetros clásicos de laboratorio: Ehsane et al (50), England et al (51), Green and King (52), Mentzer (53), Ricerca et al (54), Shine and Lal (55), Sirdah et al (56) y Srivastava and Bevington (57). Green and King ha demostrado mejor utilidad con un AUC de 0.991.

Discusión.

Gracias a los modernos analizadores, se dispone de acceso a nuevos índices. Tanto *Siemens (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA)* como *Abbott (Abbott Diagnostics, Santa Clara, CA, USA)* se basan en que la microcitosis esta mucho más aumentada en el grupo de portadores de talasemia mientras que el nivel de hipocromía tiende a ser mayor en ferropenia. Así pues aplican el índice M/H (%Micro/%Hypo en Siemens y MIC/HPO en Abbott) mediante el cual obtienen buenos resultados con un AUC de 0.943 y 0.948 respectivamente.

Por otro lado *Sysmex (Sysmex Corporation, Kobe, Japan)* define otro índice, el M-H (%Micro R- %Hypo-He), que obtiene un resultado superior al Green and King, con un AUC de 0.994. La incorporación a la fórmula del RDW (M-H-RDW) mejora el rendimiento diagnóstico (AUC 0.997). Con un punto de corte de -5.1 se alcanza el mejor índice de Youden, lo que supone una sensibilidad del 98.1% y especificidad de 97.1%. Sin embargo, con un punto de corte de -7.6 se consigue una sensibilidad del 100% y especificidad de 92.6%.

Así pues el índice M-H-RDW, con un punto de corte de -7.6, se alza como el mejor valor para el cribado de β talasemia, detectando a todos los enfermos (al 100% β talasémicos, al 96% IDA, al 100% talasémicos e inflamación, limitándose en casos de talasemia y IDA, que detecta al 78%) y con solo un 7.4% de falsos positivos, que serán bien clasificados finalmente al realizar las pruebas de diagnóstico definitivo. Además su aplicación es rápida, está automatizada y no genera costes adicionales. Adicionalmente restringe la medición de HbA₂ a los casos verdaderamente necesarios, optimizando los recursos sanitarios mediante la mejora de la eficiencia y racionalizando el flujo de trabajo en el laboratorio.

Todo ello nos ha llevado a elaborar un algoritmo para el diagnóstico diferencial de anemia microcítica en la práctica clínica (Figura 2).

VI. CONCLUSIONES.

En este trabajo se presenta la gran utilidad de los modernos analizadores de laboratorio y se explora la capacidad de sus parámetros para solventar dudas diagnósticas en el manejo de situaciones de anemia microcítica.

Específicamente, las conclusiones que se han obtenido de acuerdo con los objetivos planeados son:

1. Se han recopilado y presentado los diversos parámetros aportados por los analizadores *Abbott (Abbott Diagnostics, Santa Clara, CA, USA)*, *Siemens (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA)*, *Sysmex (Sysmex Corporation, Kobe, Japan)* y *Beckman Coulter (Beckman Coulter Inc. Miami, FL, USA)*.
2. Se han evaluado los índices basados en los parámetros clásicos y los aportados por los nuevos analizadores, delimitando cuáles son útiles en el diagnóstico etiológico de microcitosia ya que amplifican las diferencias observadas en ambas anemias (talasémica o no talasémica).
3. Se ha comparado la utilidad como prueba de "screening" de β talasemia de los diversos índices estudiados y se ha establecido que el M-H-RDW de Sysmex arroja los mejores resultados.
4. Se ha propuesto un algoritmo diagnóstico que permite aplicar en la práctica clínica diaria los conocimientos recopilados en este estudio.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Jacobs K, Sohemaker C, Rudersdorf R. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature*. 1985; 313: p. 806-810.
2. Gough N, Gough J, Metcalf D. Molecular cloning of cDNA encoding a murine haematopoietic growth regulator, granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Nature*. 1984; 309: p. 763-767.
3. Stanley E, Heard P. Factores regulating macrophage production and growth: purification and some properties of the colony stimulating factor from medium conditioned by mouse L cells. *J Biol Chem*. 1997; 252: p. 4305-4312.
4. Burgess A, Camakaris J, Metcalf D. Purification and properties of colony-stimulating factor from mouse lung-conditioned medium. *J Biol Chem*. 1977; 252: p. 1998-2003.
5. Brugnara C. Use of reticulocyte cellular indices in the diagnosis and treatment of hematological disorders. *Int J Clin Lab Res*. 1998; 28: p. 1-11.
6. Metcalf D. Hematopoietic cytokines. *Blood*. 2008; 111: p. 485-491.
7. Naets J. The role of the kidney in erythropoiesis. *J Clin Invest*. 1960; 39: p. 102-110.
8. Dordal M, Wang F, Goldwasser E. The role of carbohydrate in erythropoietin action. *Endocrinology*. 1985; 116: p. 2293-2299.
9. Hoffman R, Benz E, Shattil S, Furie B, Cohen H, Silberstein L, et al. *Hematology Basic principles and practice*. 4th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005.

Bibliografía.

10. Adamson J, Longo D. Anemia and Polycitemia. In Braunwald FKHLJ. Harrison: Internal Medicine principles. 15th ed. Madrid: Inter-American McGraw-Hill; 2002. p. 410-417.
11. Hillman R. Agentes hematopoyéticos: Factores de crecimiento, minerales y vitaminas. In Goodman , Gilman. Las bases farmacológicas de la Terapéutica. 8th ed.; 1991. p. 1239-1272.
12. Hillman R, Ault K. Clinical approach to anemia. In Hematology in clinical Practice. 4th ed. New York: McGraw-Hill; 2005. p. 29-50.
13. Andrews NC. Forging a field: the golden age of iron biology. Blood. 2008; 122: p. 219-230.
14. Miret S, Simpson R, McKie A. Physiology and molecular biology of dietary iron absorption. Annu Rev Nutr. 2003; 23: p. 283-301.
15. Ponka P, Beaumont C, Richardson D. Function and regulation of transferrin and ferritin. Semin Hematol. 1998; 35: p. 35-54.
16. Dassler K, Zydek M, Wandzik K, Kaup M, Fuchs H. Release of the soluble transferrin receptor is directly regulated by binding of its ligand ferritransferrin. J Biol Chem. 2006; 281: p. 3297-3304.
17. Edison E, Bajel A, Chandí M. Iron homeostasis: new players, newer insights. Eur J Hemat. 2008; 81: p. 411-414.
18. Urrechaga E, Borque L, Escanero J. Biomarkers of Hypochromia: The Contemporary Assessment of Iron Status and Erythropoiesis. BioMed Research International. 2013;: p. Volume 2013 (ID 603786).

Bibliografía.

19. Fleming R, Bacon B. Orchestration of iron homeostasis. *N Eng J Med.* 2005; 352: p. 1741-1744.
20. Nemeth E, Tuttle M, Powelson J, Vaughn M, Donovan A, Ward D, et al. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science.* 2004;(306): p. 2090-2093.
21. VanAssendelft O. Laboratory test in the differential diagnosis of anemia. *Lab Medica.* 1986; 3: p. 21.
22. Teffery A. Anemia in adults: a contemporary approach to diagnosis. *Mayo Clin Proc.* 2003; 78: p. 1274-1280.
23. World Health Organization. Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005. Geneva: WHO, WHO Global Database on Anaemia; 2008.
24. Guyatt G, Oxman A, Ali M, Willan A, McIlroy W, Patterson C. Laboratory diagnosis of iron-deficiency anemia: an overview. *J Gen Intern Med.* 1992; 7: p. 145-153.
25. Juncá J, Flores A, Roy C, Alberti R, Millá F. Red cell distribution width, free erythrocyte protoporphyrin, and England-Fraser index in the differential diagnosis of microcytosis due to iron deficiency or beta-thalassemia trait. A study of 200 cases of microcytic anemia. *Hematol Pathol.* 1991; 5(1): p. 33-36.
26. Beguin Y. Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. *Clin Chim Acta.* 2003; 329: p. 9-22.
27. Vernet M. The transferrin receptor: its role in iron metabolism and its diagnosis utility. *Ann Biol Clin Paris.* 1999; 57: p. 9-18.
28. Rund D, Rachmilewitz E. B thalassemia. *N Engl J Med.* 2005; 353:

Bibliografía.

- p. 1135-1146.
29. Angastiniotis M, Modell B. Global epidemiology of hemoglobin disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 850: p. 251-269.
 30. Weatherall D, Clegg J. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ.* 2001; 79: p. 704-712.
 31. Henderson S, Timbs A, McCarthy J, Gallienne A, VanMourik M, Masters G, et al. Incidence of haemoglobinopathies in various populations. The impact of immigration. *Clin Biochem.* 2009; 42(18): p. 1745-1756.
 32. Kazazian H. The thalassemias syndromes: molecular basics and prenatal diagnosis in 1990. *Semin Hematol.* 1990; 27: p. 209-228.
 33. Old J. Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders. *Blood Rev.* 2003; 17: p. 43-53.
 34. Bank A. Genetic defects in thalassemias. *Curr Top Hematol.* 1985; 5: p. 1-23.
 35. Giordano P. The effect of iron deficiency anemia on the levels of hemoglobins subtypes: possible consequences for clinical diagnosis. *Clin Lab Hematol.* 2003; 25: p. 203.
 36. Mosca A, Paleari R, Ivaldi G, Galanello R, Giordano P. The role of haemoglobin A2 testing in the diagnosis of thalassaemias and related haemoglobinopathies. *J Clin Pathol.* 2009; 62(1): p. 13-17.
 37. Urrechaga E, Izquierdo S, Escanero J. Looking back to our roots: 80 years of Wintrobe's indices. *EMJ Hema.* 2014; 1: p. 133-137.

Bibliografía.

38. Goodnough L, Skikne B, Brugnara C. Erythropoietin, iron, and erythropoiesis. *Blood*. 2000; 96(3): p. 823-833.
39. Urrechaga E, Izquierdo S, Escanero J. Microcytic Anemia Still a Health Problem in the Third Millennium. *IJTCM*. 2013; 1(2): p. 201.
40. Urrechaga E, Borque L, Escanero J. The Role of Automated Measurement of RBC Subpopulations in Differential Diagnosis of Microcytic Anemia and β -Thalassemia Screening. *Am J Clin Pathol*. 2011; 135(37): p. 4-379.
41. Ganz T, E N. Iron sequestration and anemia of inflammation. *Seminars in Hematology*. 2009; 46(4): p. 387-393.
42. Coyne D. Iron indices: what do they really mean? *Kidney international Supplements*. 2006; 101: p. S4-S8.
43. Mast A. The clinical utility of peripheral blood tests in the diagnosis of iron deficiency anemia. *Bloodline*. 2001; 1: p. 7-9.
44. Kalantar-Zadeh K, Rodriguez R, Humphreys M. Association between serum ferritin and measures of inflammation, nutrition and iron in haemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2004; 19(1): p. 141-149.
45. Rubio E, Martínez T, Rubio E, García A, Dolado F, Sánchez E. *Bioestadística en ciencias de la vida*. 1st ed. Bioestadística Cd, editor. Zaragoza: Universidad de Zaragoza; 2005.
46. Manual de usuario de los analizadores Siemens (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA), Abbott (Abbott Diagnostics, Santa Clara, CA, USA), Sysmex (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) y Beckman Coulter (Beckman Coulter Inc. Miami, FL,

Bibliografía.

USA).

47. Urrechaga E, Borque L, Escanero J. Analysis of reticulocyte parameters on the Sysmex XE 5000 and LH 750 analyzers in the diagnosis of inefficient erythropoiesis. *International Journal of Laboratory Hematology* DOI. 2011 Feb; 33(1): p. 37-44.
48. Schoorl M, Snijders D, Schoorl M, Boersma W, Bartels P. Transient impairment of reticulocyte hemoglobin content and hepcidin-25 induction in patients with community-acquired pneumonia. *Scand J Clin Lab Invest*. 2013 February; 73(1): p. 54-60.
49. Urrechaga E, Borque L, Escanero J. Erythrocyte and Reticulocyte Parameters in Iron Deficiency and Thalassemia. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2011; 25: p. 223-228.
50. Ehsani M, Shahghol E, Rahiminejad M. A new index for discrimination between iron deficiency anemia and beta-thalassemia minor: results in 284 patients. *Pak J Biol Sci*. 2009; 12: p. 473-475.
51. England J, Bain B, Fraser P. Differentiation of iron deficiency from thalassaemia trait. *Lancet*. 1973; 1: p. 1514.
52. Green R, King R. A new red cell discriminant incorporating volume dispersion for differentiating iron deficiency anemia from thalassemia minor. *Blood Cells*. 1989; 5: p. 481-495.
53. Mentzer W. Differentiation of iron deficiency from thalassaemia trait. *Lancet*. 1973; 1: p. 882.
54. Ricerca B, Storti S, d'Onofrio G. Differentiation of iron deficiency from thalassaemia trait: a new approach. *Haematologica*. 1987; 72:

Bibliografía.

p. 409-413.

55. Shine I, Lal S. A strategy to detect beta-thalassemia minor. *Lancet*. 1977; 1: p. 692-694.
56. Sirdah M, Tarazi I, AlNajjar E. Evaluation of the diagnostic reliability of different RBC indices and formulas in the differentiation of B-thalassaemia minor from iron deficiency in Palestinian population. *Int J Lab Hematol*. 2008; 30: p. 324-330.
57. Srivastava P, Bevington J. Iron deficiency and-or thalassaemia trait. *Lancet*. 1973; 1: p. 832.
58. d'Onorio G, Zini G, Ricerca B, Mancini S, Mango G. Automated measurement of red blood cell microcytosis and hypochromia in iron deficiency and beta-thalassemia trait. *Arch Pathol Lab Med*. 1992; 116(84): p. 9.
59. Urrechaga E, Hoffmann J, Izquierdo S, Escanero J. Differential diagnosis of microcytic anemia: the role of microcytic and hypochromic erythrocytes. *Int Jnl Lab Hem*. 2014 May.
60. Urrechaga E. Discriminant value of % microcytic/ % hypochromic ration in the differential diagnosis of microcytic anemia. *Clin Chem Lab Med*. 2008; 46: p. 1752-1758.
61. Urrechaga E, Borque L, Escanero J. The Role of Automated Measurement of RBC Subpopulations in Differential Diagnosis of Microcytic Anemia and β -Thalassemia Screening. *Am J Clin Pathol*. 2011; 135: p. 374-379.
62. Urrechaga E, Izquierdo S, Escanero J. Microcytic Anemia Still a Health Problem in the Third Millennium. *IJTCM*. 2013; 1(2): p. 201.

Bibliografia.

63. Brugnara C. Iron deficiency and erythropoiesis: New diagnostic approaches. *Clin Chem.* 2003; 49: p. 1573-1578.
64. Tessitore N, Solero G, Lippi G, Bassi A, Faccini G, Bedogna V. The role of iron status markers in predicting response to intravenous iron in haemodialysis patients on maintenance erythropoietin. *Nephrol Dial Transplan.* 2001; 16: p. 1416-1423.
65. Tussing-Humphreys L, Pustacioglu C, Nemeth E, Braunschweig C. Rethinking Iron Regulation and Assessment in Iron Deficiency, Anemia of Chronic Disease, and Obesity: Introducing Hepcidin. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics.* 2012 March; 112(3): p. 391-400.

VIII. ANEXOS.

VIII.1. ANEXO I.

VIII.1.1. Principio Coulter.

Los analizadores Beckman-Coulter serie LH son contadores totalmente automatizados que utilizan dos tipos de tecnología: el Principio de Impedancia y la Tecnología VCS.

Se tienen dos recipientes llenos de un tampón o líquido conductor que se comunican únicamente por una abertura. En cada recipiente hay un electrodo, conectado a una fuente de alimentación y a un osciloscopio que detecta intensidades de corriente eléctrica. Al estar conectados ambos electrodos entre sí, a través de la abertura se produce un paso de corriente que se traduce en una línea continua máxima en el osciloscopio.

Si se sustituye el tampón por una suspensión de células sanguíneas, se detectan cambios de corriente eléctrica cada vez que una célula pasa a través de la abertura. Este cambio o pulso es proporcional al tamaño o volumen de la partícula que la atraviesa. Si se contabilizan el número de pulsos detectados y se mide su altura, puede saberse el número de células que han pasado a través de la abertura y su tamaño (V). La conductividad de las células se determina por radiofrecuencia e informa sobre sus características internas ©. La dispersión de luz (S) se obtiene cuando las células pasan a través del láser e informa de los gránulos citoplasmáticos.

Al trasladar los valores de V, C y S de cada célula a una gráfica tridimensional, se obtiene el diagrama de dispersión, en el cual el Volumen se representa en el eje Y; conductividad o medida de radiofrecuencia se representa en el eje Z y la dispersión en el eje X.

La determinación de reticulocitos se hace a partir de una fracción de sangre total en la cámara de tinción, donde el reactivo nuevo azul de metileno tiñe el RNA del reticulocito; de allí pasa a la cámara de aclarado donde se lava y

esferocita el reticulocito. Además, se elimina la Hb de los hematíes y reticulocitos, para que esta no interfiera en la valoración de la dispersión laser. A continuación se clasifican las células por un análisis tridimensional V, C y S (46).

VIII.1.2. Tecnología Siemens.

Advia 2120 es un analizador hematológico completamente automatizado que proporciona el recuento completo y el diferencial leucocitario en 120 muestras a la hora.

Un volumen constante de la suspensión de células en la cámara de reacción pasa a través de la célula de flujo, donde se miden la dispersión de la luz de ángulo bajo (2° a 3°) y la dispersión de la luz del ángulo alto (5° a 15°) de cada célula. Utilizando la teoría de Mie de la dispersión de la luz para las esferas homogéneas, los valores de la dispersión para cada célula a ángulo bajo y a ángulo alto se transforman en valores de volumen y de concentración de Hb.

El mapa de RBC muestra la relación entre las medidas de la luz dispersa y las características de cada célula (volumen y concentración de Hb). El mapa de Mie, versión lineal del mapa de RBC, es un citograma de la población total de eritrocitos. La concentración de Hb se traza a lo largo del eje X y el volumen de la célula se traza a lo largo del eje Y. Los marcadores organizan el citograma en 9 áreas distintas, según la morfología de la célula roja.

En el eje X, los marcadores de la concentración de Hb se fijan en 28 g/dL y 41 g/dL. RBC con una concentración de Hb menor de 28 g/dL son hipocromas, mientras que las células con Hb mayor de 41 g/dL son hiperchromas.

En el eje Y, los marcadores del volumen de RBC se fijan en 60 fL y 120 fL. RBC con un volumen menor de 60 fL son microcíticos, mientras que las células con un volumen mayor de 120 fL son macrocíticos.

Anexos.

El porcentaje de células en cada región se calcula y se obtienen los valores de %Micro, %Macro, %Hypo y %Hyper, así como las células normocíticas y normocrómicas.

El colorante Oxazina 750 tiñe el RNA y se emplea para el recuento reticulocitario. En el canal de reticulocitos se produce la dispersión de la luz laser de la misma manera que en el canal eritrocitario, así se obtienen los valores de volumen y concentración de Hb. El contenido de Hb del reticulocito (CHr) se obtienen multiplicando ambos valores (46).

VIII.1.3. Tecnología Abbot.

En 2010, Abbott Diagnostics introdujo los parámetros extendidos en su analizador CELL-DYN Sapphire. La tecnología usada fue la división multiangular de una luz laser a través de un hematíe esférico y depende de la teoría de MIE, al igual que los analizadores Advia. Así pues los parámetros extendidos son similares en ambos analizadores, manteniendo aún así, diferencias de nomenclatura.

Los parámetros extendidos se producen mediante la información obtenida por la difracción de la luz en 3 distintos ángulos y a través de señal fluorescente para los reticulocitos. A través de fórmulas matemáticas automatizadas, se usa la información recogida para calcular para cada célula individual su volumen (V) y su concentración de Hb (CHC). Estos mismos parámetros son los calculados para los reticulocitos (MCVr, volumen celular medio reticulocitario; MCHr, concentración celular media de Hb en reticulocitos).

De esta manera RBC puede ser clasificado considerando la concentración de Hb; %HPO es el porcentaje de RBC hipocrómicas con CHC < 280 g/L; %HPR es el porcentaje de RBC hipercrómicas con CHC > 410 g/L.

Aunque estos parámetros se correlacionan en gran medida con los de Siemens, los valores absolutos difieren por lo que es necesario establecer rangos de referencia para cada instrumento individualmente. Por otro lado su utilidad clínica es comparable (18).

VIII.1.4. Tecnología Sysmex.

El tamaño de las células sanguíneas se detecta por medio de los cambios en la resistencia de la corriente continua y la densidad del interior de las células sanguíneas (tamaño del núcleo y otra información) por medio de los cambios de la resistencia de la radiofrecuencia; esta detección se produce en forma de impulsos eléctricos. En base al tamaño de estos impulsos se puede dibujar una distribución bidimensional (diagrama de dispersión) de tamaño de las células sanguíneas y de la densidad interior.

En el diagrama de distribución de tamaños de los eritrocitos aparecen entre dos discriminadores, uno inferior y otro superior, que se establecen automáticamente entre 75 fL y 200fL, respectivamente. La población de eritrocitos queda clasificada en una de estas tres zonas; se calculan los porcentajes de células en cada región y se obtienen los parámetros %Micro R y %Macro R.

En el canal de reticulocitos la citometría de flujo por fluorescencia utiliza la emisión de luz por parte de RNA y DNA teñidos para separar poblaciones de células mediante análisis de dispersión.

El haz emitido por un laser semiconductor se dirige hacia las células sanguíneas que pasan a través de la célula de flujo. La luz dispersa frontal es captada por el fotodiodo, y la luz dispersa y fluorescente lateral es captada por los tubos fotomultiplicadores. Esta luz se convierte en impulsos eléctricos, lo que hace posible realizar análisis detallados de los diagramas de dispersión. En el eje Y se representa la luz dispersa frontal, que proporciona información sobre el tamaño de las células mientras que en el eje X aparece la luz fluorescente lateral.

La intensidad de la luz fluorescente emitida lateralmente indica el grado de tinción de las células sanguíneas y de este modo proporciona información sobre la complejidad de la célula.

Anexos.

Ret Y/Ret-He (equivalente de Hb de los reticulocitos) es un parámetro exclusivo desarrollado por Sysmex que se obtienen utilizando las señales de luz dispersa de los reticulocitos y una ecuación de cálculo propia de Sysmex. RBC Y/RBC-He (equivalente de Hb de los eritrocitos) se calcula con los valores de luz dispersa frontal de las células que no presentan señal de fluorescencia mediante una ecuación de cálculo propia de Sysmex.

El Sysmex XE 5000 introduce además otro algoritmo que divide esta señal de dispersión frontal de los eritrocitos en tres zonas lo que permite calcular los porcentajes de células en cada región y obtener los parámetros %Hypo-He y %Hyper-He (46).