Aggiornamento diagnostico

Quantificazione assoluta degli eritrociti nucleati (nRBC) nei cani mediante l'analizzatore cellulare IDEXX inVue Dx

Introduzione

Gli eritrociti nucleati (nRBC) sono precursori eritroidi immaturi che conservano il nucleo. Nei cani e nei gatti adulti sani, gli eritrociti circolanti sono privi di nucleo, mentre gli nRBC sono normalmente confinati al midollo osseo e alla milza. La presenza di nRBC nel sangue periferico si osserva generalmente solo in specifiche condizioni cliniche. Gli nRBC possono accompagnare una risposta rigenerativa del midollo osseo, valutabile al meglio mediante un aumento della conta reticolocitaria. Al contrario, la presenza di nRBC circolanti in assenza di una concomitante reticolocitosi può indicare la presenza di patologie sottostanti, tra cui malattie del midollo osseo o della milza.[1]

Gli nRBC sono considerati un marker riconosciuto di malattia grave nel cane e nel gatto, essendo associati alla severità della patologia e, in alcune condizioni, a un aumento della mortalità.[2–9] Nel cane, la loro presenza è stata descritta in corso di colpo di calore, neoplasie spleniche, anemie rigenerative, condizioni critiche, traumi, sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS) e intossicazione da piombo.[2–6] Nel gatto, è stata riportata in pazienti con condizioni critiche, traumi, infezioni da FeLV/FIV e altre patologie sistemiche.[7–9] Sebbene la presenza di nRBC circolanti sia generalmente associata a una prognosi meno favorevole, il loro significato prognostico può variare in funzione della patologia sottostante.[10]

In medicina veterinaria, gli nRBC vengono tradizionalmente espressi come numero di nRBC per 100 leucociti (WBC) sulla base della valutazione microscopica dello striscio ematico. Tuttavia, poiché questa misura è influenzata dalla conta leucocitaria, condizioni di leucocitosi o leucopenia possono alterare significativamente il valore relativo degli nRBC, anche quando la loro concentrazione assoluta rimane invariata (Tabella 1). Ciò può determinare una significativa sovra- o sottostima della presenza di eritrociti nucleati circolanti e rendere più complessa la valutazione della gravità clinica e il monitoraggio delle variazioni nel tempo.

Parametro	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4
WBC (K/µL)	2	5	10	30
nRBC (K/µL)	0,3	0,3	0,3	0,3
nRBC/100 WBC	15	6	3	1

Tabella 1. Variazione del rapporto nRBC/100 WBC in funzione della conta leucocitaria, a fronte di una concentrazione assoluta di nRBC costante. Il valore di nRBC/100 WBC è stato calcolato come (nRBC ÷ WBC) × 100, mantenendo la concentrazione assoluta di nRBC costante a 0,3 K/µL. L'ampia variabilità del valore relativo (fino a 15 volte) è attribuibile esclusivamente alle variazioni della conta leucocitaria e non a modifiche del rilascio dei precursori eritroidi.

I recenti progressi nel campo degli analizzatori ematologici automatizzati hanno reso possibile la quantificazione degli nRBC come concentrazione assoluta (K/µL), indipendentemente dalle variazioni della conta leucocitaria (WBC).[11]

Il conteggio automatizzato degli nRBC è disponibile negli analizzatori ematologici per uso umano dalla fine degli anni '90. Nel 2016, l'International Council for Standardization in Haematology (ICSH) ha raccomandato, ove consentito dalla tecnologia disponibile, di refertare gli nRBC come concentrazione assoluta in unità SI ($\times 10^9$/L) anziché come numero di nRBC per 100 leucociti, evidenziando come il conteggio assoluto fornisca informazioni clinicamente più significative.[12]

In medicina veterinaria, gli nRBC vengono tradizionalmente riportati come numero di eritrociti nucleati per 100 leucociti (WBC), sulla base della valutazione microscopica dello striscio ematico. Questa modalità di refertazione deriva da due limitazioni storiche: in passato gli strumenti automatizzati non erano in grado di fornire una concentrazione assoluta degli nRBC e, inoltre, gli analizzatori emocromocitometrici basati sull'impedenza classificavano gli nRBC come leucociti, rendendo necessaria una correzione manuale della conta leucocitaria. A differenza degli analizzatori ematologici basati esclusivamente sull'impedenza, gli strumenti che utilizzano la citometria a flusso laser, come il ProCyte Dx™, sono meno soggetti alle interferenze causate dagli nRBC nella determinazione della conta leucocitaria totale. Analogamente, l'analizzatore ematologico automatizzato Sysmex™ XN-V, ampiamente utilizzato nei laboratori di riferimento, impiega un canale di fluorescenza dedicato per l'identificazione e la quantificazione degli nRBC. L'analizzatore ProCyte Dx è stato sviluppato e viene prodotto in collaborazione con Sysmex, con l'obiettivo di rendere disponibile in clinica la stessa tecnologia impiegata nei laboratori di riferimento. Entrambi gli analizzatori segnalano i campioni nei quali si sospetta la presenza di nRBC, evitando che tali cellule vengano erroneamente incluse nella conta leucocitaria. La presenza di questo flag indica la necessità di una valutazione morfologica dello striscio ematico per confermare il risultato o, meno frequentemente, correggere la conta leucocitaria totale e/o differenziale.

L'analizzatore cellulare IDEXX inVue Dx™, utilizzato in combinazione con un analizzatore ematologico ProCyte One™ o ProCyte Dx™, fornisce una valutazione ematologica completa direttamente in clinica. Quando gli nRBC vengono identificati mediante l'analisi cellulare eseguita da inVue Dx, ne viene determinata la concentrazione assoluta (K/µL) e le conte leucocitarie totale e differenziale vengono aggiornate o confermate per tenere conto del loro limitato contributo alla popolazione leucocitaria. Gli nRBC e gli eritrociti vengono

identificati mediante analisi delle immagini supportata dall'intelligenza artificiale, che consente di determinare il rapporto nRBC/RBC. Tale rapporto viene quindi moltiplicato per la concentrazione eritrocitaria ottenuta dall'esame emocromocitometrico completo, permettendo di determinare la concentrazione assoluta di nRBC (K/µL) riportata nel referto.

L'analizzatore consente di ottenere direttamente in clinica risultati che in precedenza richiedevano l'esame dello striscio ematico o il supporto di un laboratorio di riferimento, inclusi il rilevamento, la conferma e la quantificazione degli nRBC, nonché la correzione della conta leucocitaria differenziale, senza necessità di interventi manuali in alcuna fase del processo. In questo modo, la quantificazione automatizzata degli nRBC in valore assoluto è disponibile direttamente in clinica.

In parte a causa delle modalità con cui gli nRBC sono stati storicamente refertati, attualmente non sono disponibili intervalli di riferimento consolidati per la concentrazione assoluta automatizzata degli nRBC nel cane. Tuttavia, è stato definito un valore soglia al di sotto del quale la loro presenza è generalmente considerata clinicamente non significativa. L'analizzatore IDEXX inVue Dx™ rileva alterazioni morfologiche degli eritrociti e, quando i risultati vengono integrati con quelli dell'emocromo ottenuto mediante ProCyte One™ o ProCyte Dx™, fornisce considerazioni diagnostiche utili a interpretarne il potenziale significato clinico. In generale, all'esame dello striscio ematico, il riscontro di ≥3 nRBC ogni 100 leucociti (WBC), corrispondente al limite superiore dell'intervallo di riferimento definito dai Laboratori di Riferimento IDEXX e a una concentrazione di 0,3 K/µL in presenza di una conta leucocitaria di 10 K/µL, è considerato un reperto clinicamente significativo.[13]

Metodi

Generazione dell'intervallo di riferimento

Per definire l'intervallo di riferimento degli nRBC, sono stati utilizzati i valori assoluti ottenuti con l'analizzatore Sysmex™ XN-V in una coorte di riferimento composta da 93 cani clinicamente sani. Questi cani, già inclusi in un precedente studio per la definizione degli intervalli di riferimento, avevano un'età compresa tra 1 e 7 anni e non presentavano anomalie rilevabili dall'anamnesi o dall'esame clinico. Inoltre, i risultati del profilo biochimico, della concentrazione di T_4 totale e del test IDEXX SNAP™ 4Dx™ Plus erano nella norma. Nessun soggetto riceveva terapie farmacologiche, ad eccezione dei trattamenti preventivi di routine contro filariosi e parassiti.[14]

Poiché la stima non parametrica degli intervalli di riferimento richiede almeno 120 soggetti e può risultare poco affidabile quando una quota elevata di risultati si concentra al limite inferiore di rilevabilità del test, l'intervallo di riferimento per gli nRBC misurati con l'analizzatore Sysmex XN-V è stato stimato utilizzando un approccio parametrico,[15,16] fissando il limite superiore al 97,5° percentile e il limite inferiore a 0.

Confronto tra i valori di nRBC ottenuti con l'analizzatore cellulare IDEXX inVue Dx e con l'analizzatore ematologico automatizzato Sysmex XN-V

Il rilevamento degli nRBC mediante l'analizzatore IDEXX inVue Dx è stato confrontato con quello ottenuto mediante l'analizzatore ematologico automatizzato Sysmex XN-V, precedentemente validato per questo impiego.[11] Per il confronto tra le due piattaforme è stata utilizzata una coorte clinica indipendente composta da 192 cani, comprendente un ampio intervallo di concentrazioni di nRBC. Per ciascun campione sono stati ottenuti risultati appaiati con entrambi gli analizzatori. L'eventuale bias tra i due metodi è stato valutato mediante regressione di Passing-Bablok[17] su questi dati ed è stata calcolato il coefficiente di correlazione di Spearman. Gli intervalli di riferimento definiti per il Sysmex XN-V sono stati quindi trasferiti all'analizzatore IDEXX inVue Dx utilizzando i coefficienti di regressione stimati. Gli intervalli di confidenza sono stati stimati mediante un approccio non parametrico basato sul ricampionamento bootstrap dei dati.

Risultati[18]

Intervallo di riferimento

Per l'analizzatore Sysmex XN-V, il limite superiore dell'intervallo di riferimento è risultato pari a 0,12 K/µL (0,09-0,16) (Figura 1). La corrispondente stima per l'IDEXX inVue Dx ha identificato un limite superiore di riferimento pari a 0,10 K/µL (0,05-0,14) (Figura 1). Per l'analizzatore IDEXX inVue Dx, il valore soglia per la segnalazione (flag) degli nRBC è stato fissato a 0,3 K/µL, corrispondente al 99,9° percentile della distribuzione di riferimento stimata. Questa soglia è inoltre in linea con il valore tradizionalmente considerato clinicamente rilevante all'esame dello striscio ematico, secondo cui il riscontro di 3 nRBC ogni 100 leucociti (WBC), in presenza di una conta leucocitaria totale di 10 K/µL, è generalmente considerato clinicamente significativo.

Confronto tra i valori di nRBC ottenuti con l'analizzatore cellulare IDEXX inVue Dx e con l'analizzatore ematologico automatizzato Sysmex XN-V

Nella coorte di 192 cani, le concentrazioni di nRBC misurate con l'analizzatore Sysmex XN-V variavano da 0 a 26,76 K/µL e mostravano una forte correlazione con i valori ottenuti mediante l'analizzatore IDEXX inVue Dx lungo l'intero intervallo di misurazione (rho di Spearman = 0,878; IC 95%: 0,825-0,919) (Figura 2a). L'analisi mediante regressione di Passing-Bablok ha evidenziato una pendenza di 0,884 (0,791-0,93) e un'intercetta di -0,018 (-0,047-0), suggerendo una lieve tendenza dell'analizzatore IDEXX inVue Dx a fornire valori di nRBC leggermente inferiori rispetto a quelli ottenuti con Sysmex XN-V. Poiché la maggior parte dei campioni presentava valori compresi tra 0 e 1 K/µL, è riportato un ingrandimento di questo intervallo, nel quale si osserva il medesimo livello di concordanza tra i due metodi (Figura 2b).

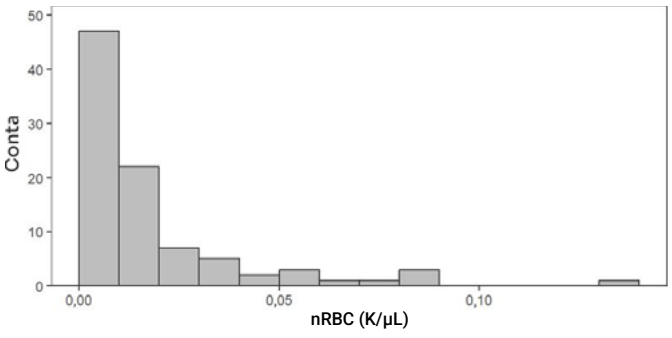


Figura 1. Distribuzione delle concentrazioni di nRBC misurate con l'analizzatore Sysmex XN-V in una coorte di riferimento composta da 93 cani.

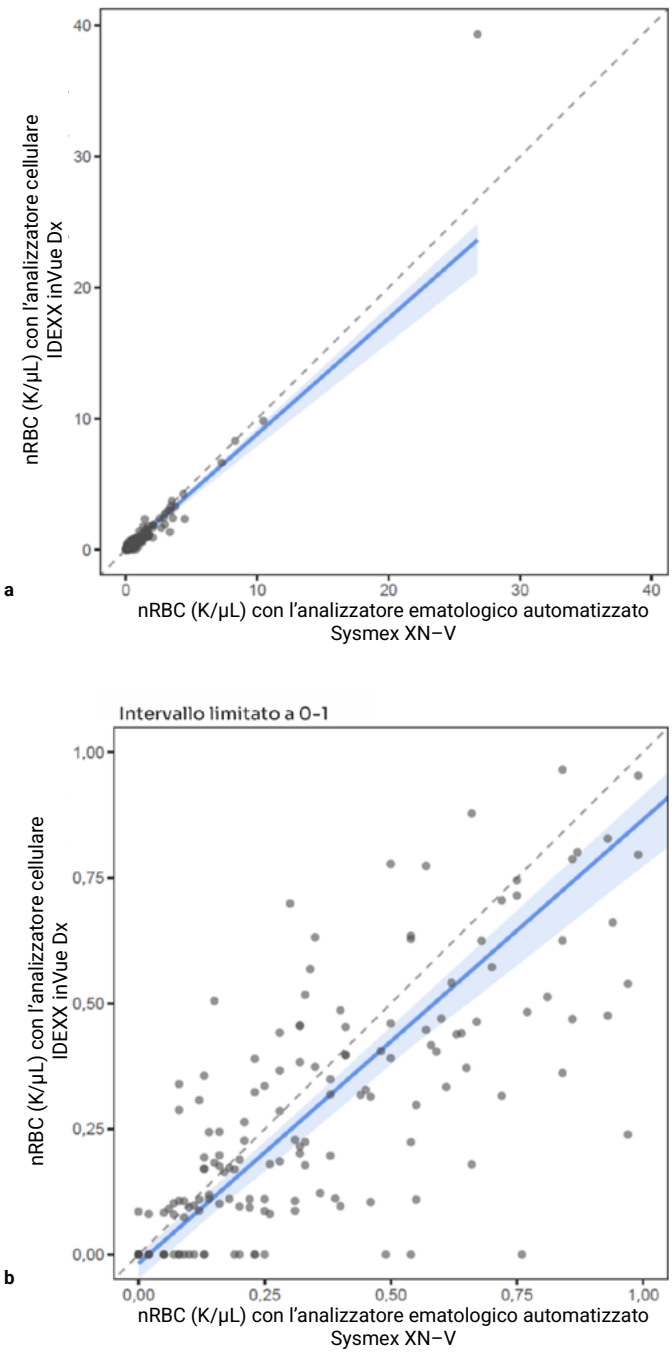


Figura 2. Confronto dei valori di nRBC ottenuti mediante l'analizzatore ematologico Sysmex™ XN-V e l'analizzatore cellulare IDEXX inVue Dx™ (n = 192): distribuzione sull'intero intervallo (a) e dettaglio dell'intervallo 0-1 K/µL (b).

Termine	Stima	95% CI
Intercetta	-0,018	(-0,047, 0)
Pendenza	0,884	(0,791, 0,93)
Rho di Spearman	0,878	(0,825, 0,919)

Tabella 2. Risultati dell'analisi di regressione di Passing-Bablok e della correlazione di Spearman per il confronto dei valori di nRBC misurati con gli analizzatori Sysmex™ XN-V e IDEXX inVue Dx™. IC, intervallo di confidenza; n = 192.

Discussione

Il presente studio fornisce una stima dell'intervallo di riferimento e della soglia di refertazione per la concentrazione assoluta di nRBC misurata con l'analizzatore cellulare IDEXX inVue Dx™. Sebbene siano necessari ulteriori studi per definire i punti decisionali clinici associati alla conta assoluta degli nRBC, i risultati forniti dall'IDEXX inVue Dx Cellular Analyzer rappresentano un metodo accurato per quantificare gli nRBC circolanti in un'ampia varietà di condizioni patologiche e nel contesto della valutazione della risposta rigenerativa. L'intervallo di riferimento definito in questo studio dimostra che, nei cani adulti sani, gli nRBC circolanti sono generalmente assenti o presenti in quantità minime. Di conseguenza, anche un modesto aumento della loro concentrazione può essere considerato al di fuori dei limiti di normalità. È stata pertanto definita una soglia di segnalazione più conservativa pari a 0,3 K/µL, sulla base di tre considerazioni principali. In primo luogo, l'intervallo di riferimento è stato ottenuto da cani non anemici e privi di reticolocitosi e potrebbe quindi non riflettere completamente la variabilità biologica della popolazione clinicamente sana. In secondo luogo, a concentrazioni molto basse di nRBC, la quantificazione si basa su un numero limitato di cellule rilevate ed è pertanto soggetta a una maggiore variabilità analitica. Infine, poiché l'IDEXX inVue Dx è stato progettato per fornire informazioni clinicamente rilevanti e orientare il clinico verso l'identificazione di possibili patologie sottostanti, questa soglia privilegia la specificità, affinché un valore segnalato di nRBC rappresenti un reperto potenzialmente significativo dal punto di vista clinico.

In assenza di punti decisionali clinici consolidati per la conta assoluta degli nRBC, questi risultati dovrebbero essere interpretati congiuntamente alla conta dei reticolociti e nel contesto del quadro clinico complessivo del paziente. Sebbene la classificazione di un'anemia come rigenerativa debba basarsi principalmente sulla conta dei reticolociti, un aumento degli nRBC (metarubriciti) proporzionato alla reticolocitosi può essere compatibile con un'adeguata risposta eritropoietica all'ipossia o alla stimolazione da eritropoietina. Al contrario, un incremento degli nRBC sproporzionato rispetto alla conta reticolocitaria può suggerire la presenza di una patologia concomitante.

Nelle anemie non rigenerative, la presenza di nRBC può essere associata a condizioni quali patologie del midollo osseo o della milza, anemia immunomediata diretta contro i precursori eritroidi, malattie infiammatorie croniche (in particolare nefropatie), sepsi, neoplasie o intossicazione da piombo.

Nei cani non anemici, gli nRBC sono generalmente assenti. La loro presenza può essere indicativa di danno midollare o di patologie del midollo osseo e/o della milza, come colpo di calore, neoplasie spleniche, sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS), intossicazione da piombo, diseritropoiesi o alcuni trattamenti chemioterapici. Tuttavia, basse concentrazioni di nRBC possono occasionalmente essere riscontrate anche in soggetti clinicamente sani di alcune razze, tra cui Schnauzer nano e Bassotto. Il monitoraggio seriale può contribuire a stabilire se l'alterazione osservata sia persistente e se richieda ulteriori approfondimenti diagnostici.

Conclusioni

La presenza di nRBC fornisce informazioni utili sulla gravità della patologia e può rappresentare un indicatore di malattie sottostanti del midollo osseo o della milza nel cane. A differenza del conteggio relativo degli nRBC espresso per 100 leucociti, la conta assoluta degli nRBC non è influenzata dalle variazioni della conta leucocitaria totale. L'analizzatore cellulare IDEXX inVue Dx™ ha dimostrato un'elevata concordanza con l'analizzatore ematologico automatizzato Sysmex™ XN-V, precedentemente validato per questo impiego. Inoltre, fornisce una conta assoluta automatizzata degli nRBC indipendente dalla conta leucocitaria, consentendo un monitoraggio più accurato delle variazioni nel tempo e offrendo nuove opportunità per approfondire la prevalenza e il significato clinico degli nRBC nella pratica veterinaria.

Riferimenti bibliografici

1. Weiss DJ, Wardrop KJ, eds. *Schalm's Veterinary Hematology*. 6th ed. Wiley-Blackwell; 2010.
2. Aroch I, Segev G, Loeb E, Bruchim Y. Peripheral nucleated red blood cells as a prognostic indicator in heatstroke in dogs. *J Vet Intern Med*. 2009;23(3):544–551. doi:10.1111/j.1939-1676.2009.0305.x
3. Cho A, Bae H, Kim Y, et al. Nucleated red blood cells for characterization of systemic inflammatory response syndrome in dogs. *J Vet Intern Med*. 2025;39(1):e17246. doi:10.1111/jvim.17246
4. Dank G, Segev K, Elazari M, Tovi-Mazaki M, Aroch I. Diagnostic and prognostic significance of rubricytosis in dogs: a retrospective case-control study of 380 cases. *Isr J Vet Med*. 2020;75(4):193–203.
5. Moretti P, Giordano A, Stefanello D, Ferrari R, Castellano S, Paltrinieri S. Nucleated erythrocytes in blood smears of dogs undergoing chemotherapy. *Vet Comp Oncol*. 2017;15(1):215–225. doi:10.1111/vco.12156
6. Müller M, Dörfelt R, Hamacher L, Wess G. Association of nucleated red blood cells with mortality in critically ill dogs. *Vet Rec*. 2014;175(20):508. doi:10.1136/vr.102398
7. Ben-Oz J, Segev G, Bilu G, Mazaki-Tovi M, Aroch I. Peripheral nucleated red blood cells in cats and their association with age, laboratory findings, diseases, morbidity and mortality—a retrospective case-control study. *Isr J Vet Med*. 2014;69(4):182–191.
8. Dörfelt R, Pabst K, Hartmann K. Nucleated red blood cells in critically ill cats. *J Feline Med Surg*. 2025;27(11):1098612X251387446. doi:10.1177/1098612X251387446
9. Shelton GH, Linenberger ML. Hematologic abnormalities associated with retroviral infections in the cat. *Semin Vet Med Surg Small Anim*. 1995;10(4):220–233.
10. Hollmann F, Geisen V, Hartmann K, Doerfelt R. Nucleated red blood cells as a prognostic indicator in dogs with anemia. *Front Vet Sci*. 2025;12:1585168. doi:10.3389/fvets.2025.1585168
11. Ginders J, Stirn M, Novacco M, Hofmann-Lehmann R, Riond B. Validation of the Sysmex XN-V automated nucleated red blood cell enumeration for canine and feline EDTA-anticoagulated blood. *Animals (Basel)*. 2024;14(3):455. doi:10.3390/ani14030455
12. Brereton M, McCafferty R, Marsden K, et al. Recommendation for standardization of haematology reporting units used in the extended blood count. *Int J Lab Hematol.* 2016;38(5):472–482. doi:10.1111/ijlh.12563
13. Mandell CP, Jain NC, Farver TB. The significance of normoblastemia and leukoerythroblastic reaction in the dog. *J Am Anim Hosp Assoc*. 1989;25(6):665–672.
14. Dati in archivio presso IDEXX Laboratories, Inc. Westbrook, Maine, Stati Uniti: *Updated Reference Intervals for IDEXX Reference Laboratories Hematology Results* [diagnostic update]; 2025.
15. Jackson CH. flexsurv: a platform for parametric survival modeling in R. *J Stat Softw.* 2016;70:i08. doi:10.18637/jss.v070.i08
16. CLSI. *Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Third Edition* [CLSI document EP28-A3c]. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
17. Potapov S, Model F, Schuetzenmeister A, et al. *mcr: Method Comparison Regression.* R package version 1.3.3.1. CRAN; 2024. www.CRAN.R-project.org/package=mcr
18. Dati in archivio presso IDEXX Laboratories, Inc. Westbrook, Maine, Stati Uniti: Hegarty E. *nRBC Reference Intervals: Sysmex Estimation and IDEXX InVue Dx Translation, 100344* (IDEXX Global Medical Organization—Medical Data Insights; September 2, 2026) [003_nRBC-RIs.Rmd].

Pubblicazione ottobre 2026.

© 2026 IDEXX Laboratories, Inc. Tutti i diritti riservati. • 09-2693249-00
Sysmex è un marchio o un marchio registrato di Sysmex Corporation. Tutti gli altri marchi sono di proprietà di IDEXX Laboratories, Inc. o delle sue affiliate negli Stati Uniti e/o in altri Paesi.
L'informativa sulla privacy di IDEXX è disponibile sul sito idexx.com.