

**“VALIDACION DE LA CUENTA TOTAL DE LEUCOCITOS
EN FROTIS SANGUÍNEO COMO ALTERNATIVA DE
CAMPO AL USO DEL HEMOCITÓMETRO EN
ESPECÍMENES DE *Salmo salar* SANOS”**

GUIDO SEBASTIÁN VÉLIZ CARDEMIL

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Patología Animal

PROFESOR GUÍA: DR. M.V. M. S. ANA MARÍA RAMÍREZ

Financiamiento: CORFO Sanitario (2009-6682)

**SANTIAGO-CHILE
2013**

Introducción

Una de las principales características de los sistemas productivos es su alto grado de intensidad, por lo que siempre es necesario contar con herramientas que nos permitan monitorear el estado sanitario de los individuos que forman parte de éste. El control de los agentes etiológicos, las enfermedades y los factores que contribuyen a su presentación como el hacinamiento, agentes estresores, nutrición, atención y manejo, permiten que los animales puedan crecer y desarrollarse logrando sus máximos potenciales genéticos en términos productivos acorde a su bienestar fisiológico.

En la actualidad existen diversas metodologías que se usan para obtener información relacionada con el estado sanitario de peces en cultivo intensivo. Estos procedimientos, dentro de los cuales se encuentran la toma de muestras de órganos y necropsias, están aceptados y validados, pero la mayoría de las veces contemplan el sacrificio del pez.

El uso de estudios hematológicos, que en la actualidad no forman parte de los métodos de rutina en salmones, también permiten el monitoreo de una población o de un mismo individuo repetidas veces. En mamíferos, se utilizan como prevención y apoyo al diagnóstico en forma rutinaria lo que es de gran valor para conocer el estado sanitario de un individuo y establecer la presencia o ausencia de una condición patológica.

Dentro de las técnicas hematológicas utilizadas en todas las especies se encuentra el método del hemocitómetro, que es el método estándar para realizar los recuentos totales de células en sangre. Otra técnica, es el estudio del frotis sanguíneo, cuyo objetivo principal es realizar los recuentos diferenciales de células y el análisis morfológico, pero que en algunas especies como humanos y caninos, se utiliza como un método indirecto para los recuentos totales de células leucocitarias. Ambas técnicas son complementarias, ya que permiten obtener la cantidad total de células sanguíneas presentes (eritrocitos, leucocitos, trombocitos), y la distribución y morfología respectivamente. Sin embargo, desde un punto de vista práctico, el método del hemocitómetro es muy complejo de utilizar en terreno debido especialmente a la experiencia del observador y al tiempo que se requiere para obtener un resultado confiable.

En humanos y caninos se ha logrado obtener estandarizaciones para la utilización del frotis sanguíneo como base para extrapolar los recuentos totales de células en sangre, lo que en peces aún no ha sido descrito, estrategia que podría tener un gran potencial de aplicación. Un método práctico y asequible como herramienta de trabajo de terreno que permita contar con una cuenta celular más efectiva en sangre de peces, permitiría instalar el uso de este tipo de exámenes como rutina para así tener una mejor aproximación del estado sanitario sin sacrificio de los animales.

De esta forma, el presente estudio tiene como objetivo principal correlacionar el método tradicional de recuento total y diferencial de células con un método indirecto efectuado sólo en frotis sanguíneo en peces sanos a fin de obtener información hematológica consistente y confiable en individuos de importancia económica.

Revisión Bibliográfica

Sangre y células sanguíneas de salmónidos:

La sangre de los peces comparte algunas características con mamíferos y aves, como el transporte de diferentes tipos de compuestos como oxígeno y dióxido de carbono, nutrientes, hormonas y productos de desecho (Farrell, 2011). En la sangre de los peces también se encuentran eritrocitos, trombocitos, linfocitos, monocitos, granulocitos, con funciones bien conservadas con respecto a las mismas células en otras especies, como mamíferos (Hrubec y Smith, 2010). La diferencia está en que todas las células sanguíneas son nucleadas y sus sitios de producción son el riñón, timo y bazo.

Los eritrocitos permiten el transporte de oxígeno unido a hemoglobina (Hrubec y Smith, 2010), y en salmónidos, constituyen el tipo celular predominante (96,5-98%), con intervalos de referencia para salmón del Atlántico (*Salmo salar*) de $0,85 - 1,1 \times 10^6$ cel/ μ L. A estas células, también se les ha atribuido una importante relación con el sistema inmune, debido a que son capaces de producir moléculas que participan de esta respuesta (Morera y MacKenzie, 2011; Morera *et al.*, 2011).

Morfológicamente, el eritrocito maduro es una célula elíptica elongada, de 13-17 μ m de largo y 7-10 μ m de ancho. Su citoplasma es de coloración rosada homogénea a la tinción corriente. El núcleo es elíptico de coloración rojo-púrpura, posee una cromatina muy compacta y se ubica central (Yasutake y Wales, 1983). Los eritrocitos inmaduros (policromatocitos) son células menos elípticas y poseen un citoplasma más basófilo y su núcleo es de color púrpura con cromatina más laxa (Yasutake y Wales, 1983) (Figura 1).

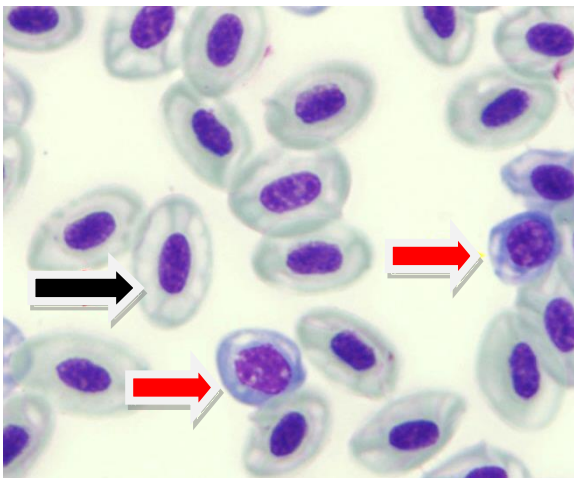


Figura 1: Frotis sanguíneo de salmón del Atlántico (*Salmo salar*). Eritrocito maduro (flecha negra). Eritrocito inmaduro o policromatocito (flecha roja). Giemsa, 100x.

Los leucocitos forman parte fundamental del sistema inmune, ya que permiten controlar las infecciones, tanto bacterianas como virales (Noro y Wittwer, 2012). Se diferencian de los eritrocitos por su función, morfología y capacidad de diapédesis, representando en los salmónidos un bajo porcentaje del total de células circulantes (2,0-3,5%) (Fänge, 1992). Se pueden distinguir dos poblaciones de leucocitos: linfocitos y granulocitos (Hrubec y Smith, 2010). En peces como la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) los linfocitos son el tipo de leucocito más frecuente (89-98%) y su número exacto en sangre es difícil de establecer debido a que presentan una morfología similar con los trombocitos (Yasutake y Wales, 1983). Su rango es amplio pudiendo alcanzar entre $7,8 - 20,9 \times 10^3/\mu\text{L}$ (Yasutake y Wales, 1983). (Figura 2).

Morfológicamente, los linfocitos son células pequeñas de 7-10 μm en diámetro, poseen un núcleo excéntrico que ocupa casi el 70% del citoplasma que a veces puede presentar pequeñas invaginaciones. La cromatina no es muy densa y se tiñe de color rojo-purpura (Noro y Wittwer, 2012). En estado inmaduro se caracterizan por ser más grandes de 10-15 μm de diámetro, su cromatina tiende a ser más laxa y la relación núcleo/citoplasma tiende a disminuir. Cuando se encuentran activados el citoplasma se torna más basófilo (hiperbasofilia) y aparecen proyecciones de tipo pseudópodos en la superficie de la membrana citoplasmática (Yasutake y Wales, 1983).

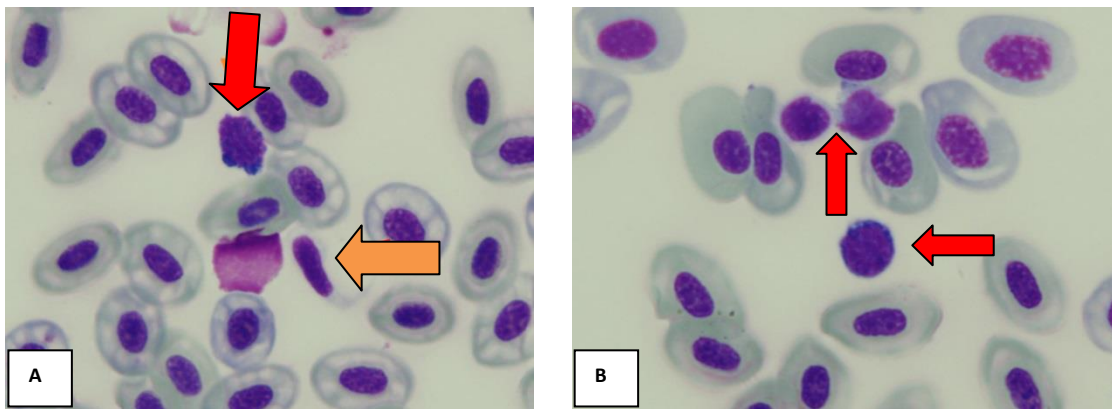


Figura 2: Frotis sanguíneo de salmón del Atlántico (*Salmo salar*). A) Linfocito activado (flecha roja). Trombocito (flecha naranja). B) Linfocitos (flecha roja). Giemsa, 100x.

Los granulocitos representan el segundo tipo de leucocito más frecuente (~20%); comprenden los heterófilos, eosinófilos y basófilos. Los heterófilos tienen un diámetro promedio entre 9 - 13 μm y el núcleo ocupa un tercio del citoplasma. Puede ser mono-, bi- o multilobulado de color violeta. El citoplasma es de color celeste con finas granulaciones y puede presentar algunas vacuolas (Noro y Wittwer, 2012; Fänge, 1992). Sus funciones están en la defensa inespecífica del individuo, inflamación y fagocitosis (Yasutake y Wales, 1983; Farrell, 2011; Hrubec y Smith, 2010).

Los eosinófilos alcanzan un número menor al 5% de los leucocitos totales. Sus funciones principales están asociadas a la respuesta antiparasitaria, modulación de reacciones alérgicas y fagocitosis (Noro y Wittwer, 2012). Miden entre 11 - 19 μm de diámetro, el núcleo es excéntrico, lobulado y ocupa entre el 20 al 30% de la célula. El citoplasma es de color celeste y presenta grandes gránulos de color naranja o rosado (Noro y Wittwer, 2012). Los basófilos que se observan en muy baja cantidad en sangre circulante, y representan < 1% de los leucocitos totales. Sus funciones no están claramente establecidas en peces, pero se asume que serían semejantes a las observadas en mamíferos (Noro y Wittwer, 2012; Yasutake y Wales, 1983; Hrubec y Smith, 2010). Los monocitos son células precursoras de los macrófagos de tejidos, y frecuentemente se encuentran en bajo número en circulación. Forman parte de la respuesta inmunológica inespecífica y fagocitosis. Son células grandes, con un núcleo voluminoso e irregular, de color azul grisáceo y cromatina laxa. El citoplasma es irregular, de color gris pálido, contiene gránulos pequeños dispersos y vacuolas de diferente tamaño (Noro y Wittwer, 2012; Fänge, 1992; Farrell, 2011).

Los trombocitos o plaquetas están relacionados con la hemostasis y corresponden al 1 - 6% de los leucocitos totales. Al frotis sanguíneo se evidencian distintos tipos morfológicos, relacionados con su estado de madurez, pudiendo encontrarse de forma elongada, espigada, fusiforme y esferoidal. La forma elongada posee un núcleo basófilo elíptico diámetro de 5 a 8 μm . Poseen un citoplasma teñido débilmente basófilo, que no siempre se puede evidenciar, observándose con un borde débil alrededor del núcleo. La forma de espiga es semejante a la forma elongada, pero su citoplasma es alargado en uno de sus extremos, como la cola de una cometa. La forma fusiforme es una célula también alargada, donde el citoplasma termina en punta en sus dos extremos. La forma esferoidal corresponde a trombocitos activados, con un núcleo denso de color púrpura y que casi no posee citoplasma. Morfológicamente, es la que más se confunde con pequeños linfocitos (Yasutake y Wales, 1983) (Figura 3).

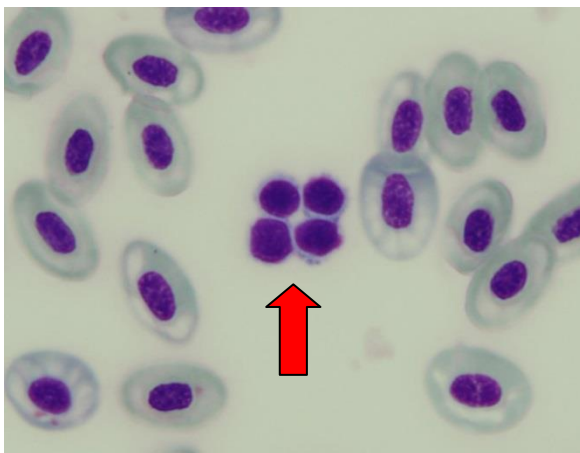


Figura 3: Frotis sanguíneo de salmón del Atlántico (*Salmo salar*). Trombocitos activados (flecha roja). Giemsa, 100x.

Técnicas Hematológicas

Las técnicas hematológicas desarrolladas para mamíferos son en general, aplicables en peces con algunas modificaciones que abordan desde la manipulación del individuo en la toma de muestra hasta detalles técnicos de la metodología. Al obtener una muestra de sangre, se produce un efecto natural de estrés, cuya magnitud va a depender de diversos factores, pero que producirá un cambio en la distribución celular entre el “pool” marginal y circulante del vaso sanguíneo debido a los efectos del cortisol (Maule y Schreck, 1990). Uno de los momentos más estresantes en los peces ocurre durante la manipulación, tanto en el agua como fuera de ella, por lo que se recomienda realizar manejos previos para controlar al máximo el estrés, como el uso de anestésicos (Burka *et al.*, 1997)

Toma de muestra

Para la obtención de sangre, la forma más común es la punción de la vena caudal, aproximadamente 5 mm posterior al ano, justo en la mitad del cuerpo o línea media (Black, 2000). La sedación e inmovilización están recomendadas para disminuir los cambios hematológicos por estrés, que en caso del salmón del Atlántico se observan en parámetros como el VGA, osmolaridad sanguínea y cloruro sérico (Hunn y Greer, 1991). Uno de los anestésicos que se encuentra aprobado por la FDA (Food and Drug Administration, EEUU) y que es considerado como el más apto, es el metasulfonato de tricaina (Hrubec y Smith, 2010). Esto es debido a que permite un plano anestésico mucho más profundo que otros anestésicos también utilizados, como la benzocaina (atil-amino-benzoato) que solo permite un plano anestésico donde sólo inhibe la función motora. El inconveniente de ambos y de la mayoría de los anestésicos es que tienen efecto hiperglicémico y aumentan el VGA (Burka *et al.*, 1997).

Sólo se deben utilizar muestras de sangre en buen estado, siendo la hemolisis la principal variable que afecta la calidad de la muestra. Para minimizar este efecto se utilizan jeringas y agujas de acuerdo a la condición física del pez, y el anticoagulante heparina litio (Hrubec y Smith, 2010). Una vez obtenida la muestra se debe traspasar inmediatamente al tubo con anticoagulante y evitar el uso de sistemas de extracción al vacío (Vacutainer®), especialmente en peces pequeños (1-500 gramos) ya que no es posible controlar la velocidad de succión del tubo de muestra lo que puede hacer colapsar los vasos.

Recuento de células sanguíneas: Método directo

Debido a que todas las células sanguíneas son nucleadas y el volumen es semejante, no es posible utilizar métodos automatizados de impedancia (Latimer y Bienzele, 2010). Además, la presencia del núcleo en los eritrocitos altera la lectura por parte del equipo, debido a un cambio de densidad que posee el núcleo, por lo tanto sólo se recomienda contar células manualmente, aún

cuando es un procedimiento que ocupa tiempo y requiere de experiencia del observador (Hrubec y Smith, 2010).

El método manual utilizado es el recuento en cámara de Neubauer (técnica del Hemocitómetro o método directo) que corresponde a un estudio cuantitativo de los elementos figurados de la sangre por unidad de volumen (N° células/ μL) (Cray y Zaias, 2004). El diluyente de elección en peces es Natt-Herrick que tiñe diferencialmente las células permitiendo visualizarlas en la cámara (Natt y Herrick, 1952). Se sugiere analizar máximo dentro de las primeras 6 horas posterior al muestreo, ya que existe un alto riesgo de que las células comiencen un proceso de envejecimiento y hemólisis aún cuando éstas se encuentren en contacto con el anticoagulante (Rehulka *et al.*, 2004; Black, 2000). Con este método es posible realizar el recuento de todas las células sanguíneas a la vez. Las diluciones recomendadas son 1:100 o 1:200 (Cray y Zaias, 2004) y el área de cuenta de células depende si son eritrocitos o leucocitos y trombocitos (Anexo 3).

La confiabilidad del recuento manual es una de las mayores dificultades que se presentan en el diagnóstico hematológico en peces, sin embargo, continúa siendo la mejor forma de obtener resultados más exactos.

Existen diversas fuentes de error del método que están asociadas principalmente a diluciones incorrectas, mezcla insuficiente de la sangre con el diluyente y llenado incorrecto de la cámara, entre otras. Es fundamental un entrenamiento adecuado del observador y el conocimiento de los errores que llevan a obtener una baja precisión y exactitud (Cray y Zaias, 2004). Errores en la identificación de células ocurren con frecuencia, por ejemplo, trombocitos activados, eritrocitos lisados y leucocitos. Sumado a lo anterior, cuando se requiere realizar análisis masivos, es probable que estos factores se vean incrementados, además de necesitar un tiempo considerable en su realización.

Recuento Diferencial

El recuento diferencial de células en el frotis sanguíneo tiene como objetivo principal obtener la fórmula diferencial de células leucocitarias y trombocitos, además del estudio morfológico de todos los elementos figurados de la sangre (Cray y Zaias, 2004).

Para ello, es fundamental realizar un buen frotis sanguíneo ya sea mediante el método del cubreobjeto o del portaobjeto (Anexo 1). En el método del cubreobjeto, se obtiene una mejor distribución de las células, sin embargo, su superficie de observación es menor. El método del portaobjeto, es el indicado cuando se realiza la extensión inmediatamente de obtenida la muestra de sangre por el volumen del que se dispone, y permite una distribución de células sólo en la parte final del extendido. Ambos métodos sirven para preservar la sangre antes de teñir, especialmente si se envían muestras desde lugares distantes al laboratorio. No es necesario fijar el tejido una vez

realizado el extendido. Sólo basta con dejarlo en un lugar protegido de la luz y la humedad. La conservación puede prolongarse en buenas condiciones hasta por un mes (Cray y Zaias, 2004).

Para la tinción del frotis esta universalmente aceptado las tinciones de Romanowsky, entre las cuales se encuentra; Wright, Giemsa, Wright-Giemsa y DiffQuik. Estas tinciones están formados por azul de metileno y eosina, donde las nucleoproteínas del núcleo reaccionan con el azul de metileno (color azulado) y el citoplasma alcalino de los leucocitos y los grupos básicos de la hemoglobina del eritrocito reaccionan con la eosina, dando distintas tonalidades de rojo (Cray y Zaias, 2004).

Para el recuento diferencial se deben contar un rango entre 100 a 500 células totales entre trombocitos y leucocitos separadamente. Una vez obtenida la fórmula diferencial se calculan sus valores porcentuales y se resta al resultado de trombocitos el total obtenido en la cámara de Neubauer donde se contaron los leucocitos. Así se puede obtener separadamente la cuenta total de leucocitos y trombocitos (Hrubec y Smith, 2010).

Recuento de células sanguíneas: Método indirecto

Las aves, al igual que los peces, presentan dificultades al momento de realizar recuentos celulares, especialmente en individuos cuya finalidad es productiva, ya que los métodos actualmente utilizados están orientados al ejercicio de una medicina más individual que masiva. Sin embargo, algunos autores han considerado la estimación de células a través de un frotis sanguíneo como un indicador de la concentración de leucocitos en diferentes especies (Walberg, 2001; Clark *et al.*, 2009; Latimer y Bienzele, 2010). Walberg (2001), desarrolló y validó una fórmula para la estimación de leucocitos totales en frotis sanguíneo de aves que se obtiene a partir del promedio de células contadas en un mínimo de 10 campos consecutivos en aumento mayor (40x) y multiplicado por 2.000. La mejor aproximación y disminución del error inherente a todo método depende de una buena preparación del extendido de sangre, un buen entrenamiento citológico del observador y la ausencia de lisis celular. Este autor sugiere utilizar el método siempre y cuando se tomen las consideraciones anteriores ya que, si bien el recuento indirecto no tiene la exactitud ni precisión del recuento directo en cámara de Neubauer, puede ser un procedimiento asequible y de uso rutinario en terreno para monitoreo de poblaciones animales bajo condiciones de alta densidad poblacional (Latimer y Bienzele, 2010).

En consideración a lo anterior, es que el presente estudio pretende aportar al conocimiento de la utilidad de método indirecto de recuento de células leucocitarias en peces sanos, para así poder disminuir las limitaciones técnicas actuales del estudio hematológico en salmónidos.

Objetivo General

- Establecer un método indirecto de cuenta total de leucocitos en frotis sanguíneo en especímenes sanos de salmón del Atlántico (*Salmo salar*).

Objetivos específicos

- Realizar recuentos totales de leucocitos mediante el método directo del hemocitómetro en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) sanos.
- Realizar recuentos totales de leucocitos mediante método indirecto en frotis sanguíneo de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) sanos.
- Comparar ambos métodos respecto del recuento total de leucocitos.

Material y Método

Individuos:

Se utilizaron 120 peces elegidos al azar pertenecientes a la especie salmón del Atlántico (*Salmo salar*) de cepa nacional, con peso promedio estimado de 212 g. Estos individuos provienen de una piscicultura experimental ubicada en Lenca, Décima Región perteneciente al Consorcio de Investigación Aquainnovo S.A. La temperatura del agua al momento del muestreo fue de 12 ± 1 C°. De acuerdo a los datos entregados por el médico veterinario a cargo de la sanidad del recinto, sólo fueron utilizados en el presente estudio peces sanos negativos a patógenos y controlados mediante exámenes de laboratorio.

Toma de Muestra:

Los ejemplares a muestrear estuvieron con ayuno de 12 horas. Cada uno fue anestesiado con una dosis de inducción rápida de 120 mg/L de metasulfonato de tricaina (Dolical 80%®, Centrovét). Cuando el pez evidenció una disminución de su frecuencia opercular (aproximadamente dos minutos) fue llevado rápidamente a la zona de trabajo destinada a la toma y preparación de las muestras. A cada ejemplar se le extrajeron 3 mL de sangre mediante punción de la vena caudal, con jeringas de 5 mL y agujas de 21 G en un ángulo de 45° con respecto a la superficie ventral, en la zona ubicada por detrás de la aleta anal (Black, 2000).

La sangre obtenida fue depositada en tubos con heparina litio (Li) (BD Vacutainer®, NJ USA. 68 USP) y homogenizada suavemente durante 30 segundos con el anticoagulante. El transporte se realizó en contenedor refrigerado (Coleman®) y registró un tiempo de 10 minutos hasta las dependencias del laboratorio de Aquainnovo S.A. Las muestras se mantuvieron refrigeradas a 4°C durante 30 minutos hasta su procesamiento.

Procesamiento de las Muestras:

1. Frotis sanguíneos: de cada muestra se realizaron tres frotis sanguíneos con anticoagulante utilizando el método del portaobjeto (anexo 1). Estos frotis fueron secados al aire, marcados y guardados en caja para su análisis en el Laboratorio de Hematología y Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

2. Microhematocrito: desde el tubo con anticoagulante se llenaron dos capilares de microhematocrito (Hirschmann® Laborgerate) por muestra. Fueron centrifugados a 12.000 rpm en centrífuga de microhematocrito (Hareus®) durante cinco minutos para obtener el Volumen Globular Aglomerado (VGA) según protocolo estándar (Schalm, 1989). El objetivo de utilizar este examen fue evidenciar en la fracción plasmática del capilar de microhematocrito los diferentes niveles de hemolisis que se presentaron en las muestras. Para ello se utilizó una escala de colores de

hemólisis (Anexo 4) el cual la clasifica según su concentración de hemoglobina libre en plasma (Dugan *et al.*, 2005). Así, las muestras que presentaron concentraciones estimadas ≥ 200 mg/dL fueron consideradas fuera del estudio.

3. Recuento total directo de células por el método del Hemocitómetro:

Para cada muestra se procedió de la siguiente forma de acuerdo a protocolo estándar (Schalm, 1989). Se extrajeron desde el tubo con anticoagulante 10 μ L de sangre que se utilizaron para obtener una dilución 1:100 con 990 μ L de diluyente Natt-Herrick (Natt y Herrick, 1952). Ésta se incubó durante 3 minutos y luego se depositó una gota en cámara de Neubauer de contraste (Improved Neubauer, BOECO®, West Germany) de 0,1 mm de profundidad y 0,0025 mm² (Anexo 3). A continuación, la cámara se colocó en microscopio óptico (Olympus® modelo bx41) durante 2 minutos hasta que la solución se estabilizó. Se inició la observación bajo objetivo menor (10x) para ubicar el cuadrante primario de recuento de leucocitos. Luego, se inició la captura de imágenes en alta resolución de cada cuadrante primario mediante un sistema digital (Olympus® software DP2-BSW modelo DP72 resolución 4.140 x 3.086 pixeles). Las imágenes obtenidas fueron guardadas en formato JPG para posteriormente ser amplificadas y utilizadas en los recuentos totales de leucocitos.

4. Estudio celular diferencial directo en el frotis sanguíneo:

Se realizó en el Laboratorio de Hematología y Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. A cada muestra obtenida se le realizaron 3 frotis de los que se seleccionaron sólo 2 por su calidad macro y microscópica. Esta calidad fue evaluada de acuerdo a lo descrito por Vap *et al.* (2012). El estudio diferencial fue realizado en microscopio óptico con objetivo de inmersión (Zeiss® 1000x). Cada frotis fue fijado con metanol absoluto y teñido con tinción Giemsa, de acuerdo al protocolo general (anexo 2). En el estudio diferencial de células (leucocitos y trombocitos) se contó un total de 100 leucocitos y separadamente se obtuvo el recuento de trombocitos. A partir de sus valores porcentuales, se obtuvo el valor absoluto (células/ μ L) de acuerdo al total obtenido en la cámara de Neubauer (Schalm, 1989).

5. Recuento indirecto de leucocitos en el frotis sanguíneo:

Las muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Hematología y Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile con los mismos frotis descritos en el punto anterior. Se utilizó la fórmula propuesta por Walberg (2001) en aves quien describe que el recuento promedio debe realizarse en un mínimo de 10 campos de observación en aumento mayor (400x) multiplicado por 2.000. Debido a la dificultad en peces para diferenciar los trombocitos de leucocitos en aumento mayor (400x), se adaptó el campo de observación para el

recuento en aumento de inmersión. Esta adaptación consistió en realizar un cálculo de áreas fotográficas por campo de observación y se obtuvo una relación entre el aumento mayor y el aumento de inmersión. El resultado de la relación fue de 1:4,89, lo que significa que cada campo de aumento mayor equivale a 4,89 veces el campo de inmersión, es decir, 5 campos. Así, el total de campos de aumento de inmersión que se utilizó fue de 50 para mantener la proporción descrita por Walberg (2001) sin modificar la fórmula ni el factor. Esta relación se corroboró mediante un ensayo al azar de recuento de leucocitos en 10 de las muestras obtenidas que se describen en el anexo 5.

Análisis estadístico:

Se utilizó la prueba de Pearson para correlacionar los datos obtenidos en el recuento indirecto en el frotis sanguíneo y los datos del recuento directo con la cámara de Neubauer y así observar el grado de asociación que existe. En el caso de existir algún grado de asociación entre los métodos evaluados, se evidenciara si existen diferencias estadísticas entre los resultados, por medio de la prueba de independencia de medias (Student). Para esto se utilizó el programa estadístico InfoStat® (Di Rienzo *et al.*, 2008).

Resultados

En la tabla N°1 se muestran los recuentos totales de leucocitos obtenidos para cada individuo en cámara de Neubauer (RTL-CN) realizados mediante el sistema de captura de imágenes conectado al microscopio.

Tabla 1. Recuentos totales de leucocitos en cámara de Neubauer (RTL-CN) mediante captura de imágenes (40x) expresado en N° de Leucocitos totales/ μ L.

N°	RTL-CN	N°	RTL-CN	N°	RTL-CN	N°	RTL-CN	N°	RTL-CN	N°	RTL-CN
1	26.996	21	15.421	41	23.405	61	17.703	81	8.776	101	13.488
2	26.950	22	10.500	42	24.140	62	18.174	82	15.930	102	17.325
3	28.070	23	22.500	43	14.341	63	19.880	83	13.313	103	26.730
4	14.438	24	21.200	44	17.156	64	23.780	84	12.238	104	16.160
5	12.469	25	27.495	45	18.955	65	14.053	85	24.375	105	31.620
6	20.825	26	20.880	46	16.385	66	24.120	86	14.381	106	28.768
7	16.000	27	31.223	47	15.039	67	14.788	87	16.516	107	16.511
8	20.896	28	32.670	48	22.588	68	24.400	88	11.600	108	19.061
9	20.714	29	17.661	49	19.250	69	21.649	89	25.515	109	13.163
10	18.270	30	19.988	50	36.225	70	22.910	90	12.750	110	23.030
11	14.919	31	16.500	51	20.355	71	15.604	91	19.075	111	26.265
12	19.454	32	24.273	52	28.373	72	12.128	92	22.539	112	13.680
13	14.706	33	22.695	53	20.200	73	29.313	93	12.900	113	15.021
14	10.585	34	21.844	54	27.500	74	30.200	94	10.694	114	23.288
15	13.160	35	17.000	55	19.175	75	27.878	95	24.083	115	16.569
16	19.920	36	14.421	56	21.808	76	14.790	96	17.570	116	12.398
17	20.825	37	18.330	57	20.825	77	29.050	97	17.029	117	27.773
18	25.436	38	12.304	58	24.915	78	29.778	98	20.805	118	13.451
19	18.188	39	21.105	59	20.663	79	21.263	99	18.506	119	15.015
20	13.309	40	18.769	60	13.650	80	23.996	100	21.760	120	23.031

En la tabla N°1 se muestran los resultados obtenidos para la variable recuento total de leucocitos en cámara de Neubauer realizados mediante el sistema de captura de imágenes conectado al microscopio. El promedio del recuento directo de leucocitos en cámara de Neubauer (RTL-CN) obtenido mediante registro de imágenes fue de 19.800 leucocitos/ μ L, con una desviación estándar de 5.628 y un coeficiente de variación de 28%. Los valores promedio de los recuentos se encuentran dentro de los valores esperados para el recuento de leucocitos totales en salmón del Atlántico.

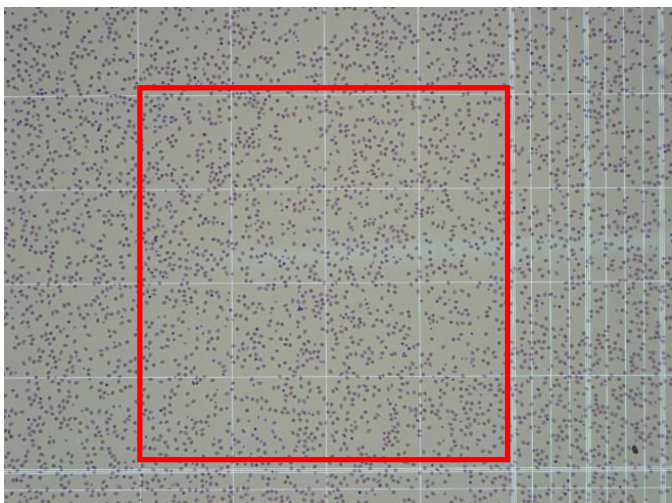


Figura 6: El cuadrado rojo delimita el área de cuadrante primario donde se realizó el recuento de leucocitos en cámara de Neubauer (campo W en anexo 3) obtenida con cámara de alta resolución Olympus® 10x.

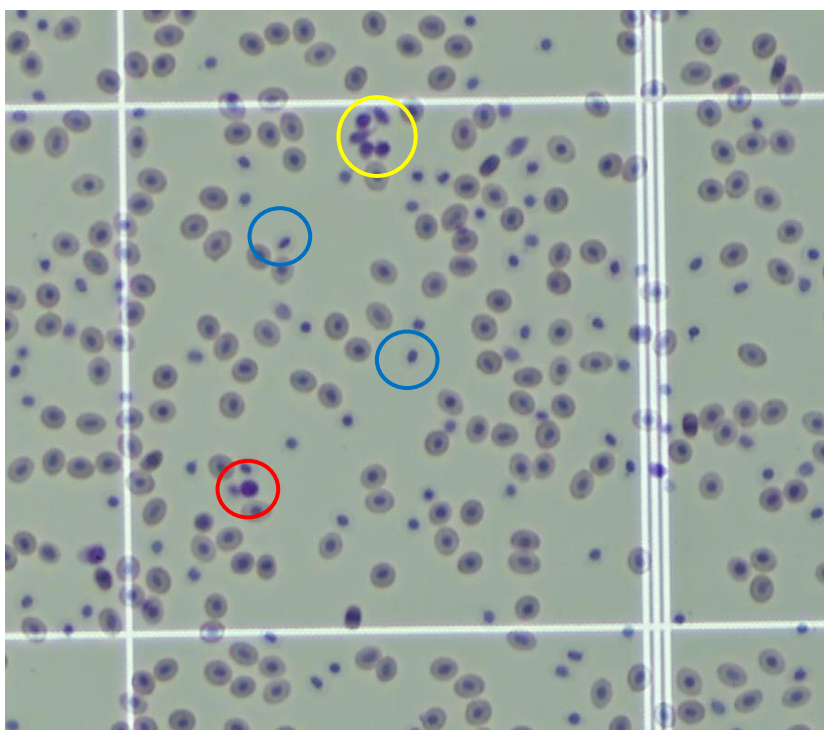


Figura 7: Imagen ampliada de cuadrante secundario para recuento de leucocitos en cámara de Neubauer (anexo 3) obtenida con cámara de alta resolución Olympus® 10x. Círculo rojo señala célula a contar. Círculo amarillo señala agrupación de trombocitos y leucocitos. Círculo azul señala eritrocitos hemolizados, los cuales se pueden confundir con trombocitos o leucocitos.

A continuación se muestran los recuentos totales de leucocitos obtenidos para cada individuo en frotis sanguíneo (RTL-FS) utilizando la fórmula de Walberg (2001).

Tabla 2. Recuentos totales de leucocitos en frotis sanguíneo (RTL-FS) en aumento de inmersión (100x) expresado en N° de Leucocitos totales/ μ L.

N°	RTL-FS	N°	RTL-FS	N°	RTL-FSN	N°	RTL-FS	N°	RTL-FS	N°	RTL-FS
1	5.680	21	4.820	41	3.580	61	8.080	81	7.140	101	8.120
2	6.600	22	4.520	42	5.080	62	5.680	82	8.220	102	8.420
3	4.700	23	6.120	43	4.960	63	6.280	83	8.440	103	10.220
4	4.820	24	4.580	44	5.360	64	10.060	84	5.980	104	7.300
5	6.760	25	4.080	45	5.000	65	6.000	85	7.460	105	9.340
6	3.360	26	2.680	46	6.600	66	12.040	86	11.340	106	11.760
7	4.260	27	5.900	47	5.820	67	8.180	87	9.680	107	5.660
8	4.480	28	5.240	48	11.600	68	7.740	88	5.500	108	5.680
9	4.540	29	6.700	49	7.420	69	7.300	89	11.720	109	5.340
10	2.960	30	9.420	50	7.280	70	10.660	90	6.100	110	9.240
11	3.820	31	3.020	51	5.100	71	6.540	91	9.520	111	6.640
12	2.600	32	5.680	52	6.440	72	8.280	92	10.320	112	5.740
13	2.920	33	3.920	53	11.300	73	9.000	93	6.180	113	5.100
14	3.000	34	4.240	54	11.400	74	7.280	94	7.140	114	7.480
15	7.820	35	4.120	55	4.460	75	7.120	95	8.080	115	5.040
16	2.340	36	3.900	56	6.720	76	5.000	96	7.320	116	8.140
17	3.760	37	6.000	57	6.720	77	7.640	97	6.680	117	12.440
18	3.860	38	3.620	58	6.500	78	4.760	98	10.980	118	5.660
19	3.680	39	3.360	59	4.360	79	10.540	99	6.620	119	7.540
20	4.380	40	8.220	60	7.440	80	4.880	100	9.200	120	8.480

En la tabla N°2 se presentan los resultados individuales para la variable recuento total de leucocitos por medio del método del recuento indirecto en frotis sanguíneo (RTL-FS). Los resultados muestran un promedio de 6.580 leucocitos/ μ L con una desviación estándar de 2.397 y un coeficiente de variación de 36,4%. El promedio de los datos no se encuentra dentro de los rangos aceptados para el recuento total de leucocitos por μ L para la especie salmón del Atlántico.

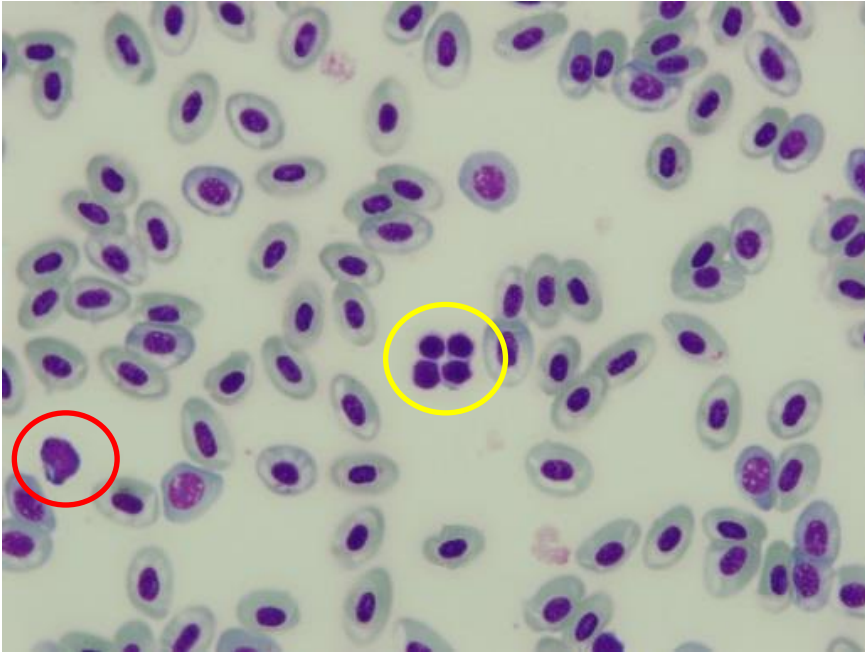
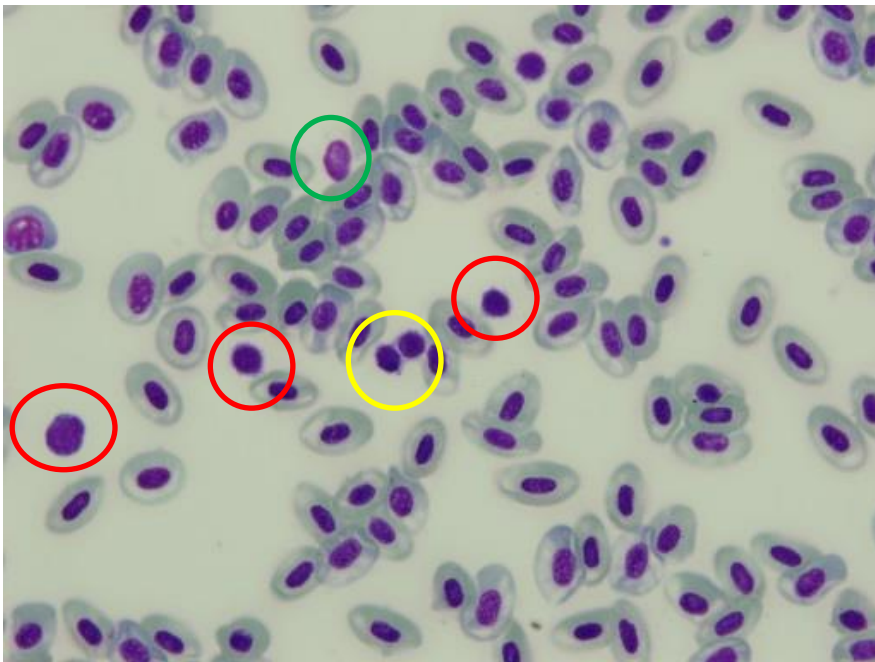


Figura 8: Imágenes de frotis sanguíneo para recuento indirecto de leucocitos. En los círculos rojos se evidencian linfocitos maduros. Los círculos amarillos corresponden a plaquetas agrupadas. Círculo verde señala eritrocito hemolizado.



Para establecer si hay correlación entre ambos métodos, se realizó una correlación de Pearson entre la RTL-CN y la RTL-FS cuyo resultado fue 0,23 ($p < 0,012$) estadísticamente significativa entre ambas variables. En la figura N°9 se observa el gráfico de dispersión y pendiente con un leve grado de asociación y una gran dispersión de los datos.

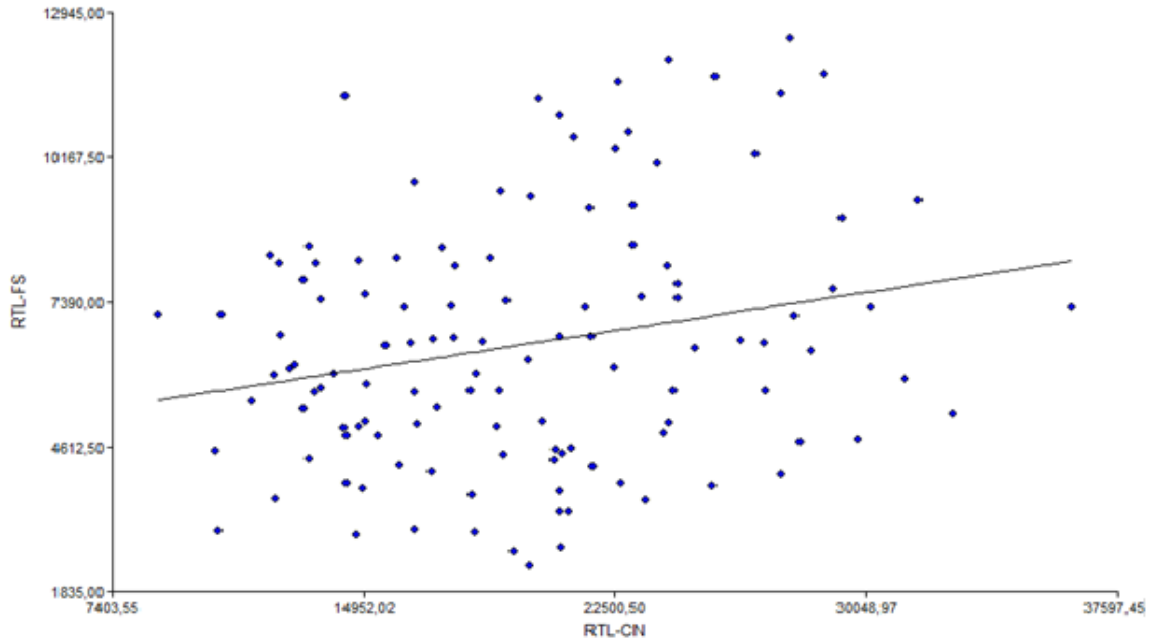


Figura N°9: Gráfico de dispersión y pendiente entre las variables RTL-CN y RTL-FS

De acuerdo con el resultado de la correlación de Pearson se realizó una prueba de independencia entre las medias, cuyos resultados arrojaron que existía diferencias significativas entre las medias de los distintos métodos ($<0,05$; $t(\text{CLT-CN})=38,539$; $t(\text{CLT-FS})=30,066$) como lo muestra la tabla N°3.

Tabla 3: Prueba de Student para las variables RTL-CN y RTL-FS

Variable	Media	Desv. Est.	t	p(Bilateral)
RTL-CN	19.800	5.628	38,54	<0,0001
RTL-FS	6.580	2.397	30,06	<0,0001

*Valor de la media bajo la hipótesis nula: 1,6576

Discusión

En el presente estudio se pretendió establecer un método indirecto de cuenta total de leucocitos en frotis sanguíneo en especímenes de salmón del Atlántico. Para ello se utilizaron 120 peces elegidos al azar clínicamente sanos los que fueron muestreados para la obtención de sangre y certificados negativos a las enfermedades más importantes que afectan la industria acuícola nacional.

Las técnicas hematológicas utilizadas en mamíferos son en general aplicables en peces, pero con algunas modificaciones. Una de ellas ocurre debido al manejo durante la toma de muestra, donde muchos peces responden negativamente por lo que es recomendable aplicar sedación o anestesia y así disminuir los efectos estresantes sobre las variables hematológicas y otras constantes fisiológicas (Blaxhall, 1972; Casillas y Smith, 1977; Kreigberg, 2000). Durante el estudio se realizó sedación mediante el uso de metasulfonato de tricaina, el cual afecta de menor manera los parámetros hematológicos (Burka, 1997; Korcock, 1988; Black, 2000). Es bien conocido su efecto depresor por lo que fue de gran importancia el uso de dosis probadas y entrenamiento en la observación del pez. No se registraron contratiempos durante la toma de muestras debido a este factor.

Anatómicamente esta especie no posee venas superficiales que faciliten la extracción de sangre a diferencia de lo que ocurre en mamíferos y aves. Sin embargo, los peces pueden ser muestreados desde diversos sitios, como el ducto cuvario, las branquias y el corazón, pero de elección se utiliza la vena caudal (Hrubec y Smith, 2010). La punción del ducto cuvario y las branquias sólo se recomienda en peces de gran tamaño y la punción cardíaca es traumática y no recomendable, especialmente si los peces se mantendrán vivos después de la toma de muestra. En este estudio se escogió la vena caudal debido al peso de los individuos y accesibilidad anatómica, además del volumen considerado y la mantención de los peces vivos. Al igual que con la sedación, el entrenamiento previo también fue un factor importante en el éxito del proceso de toma de muestras.

Sólo muestras de sangre de buena calidad deben ser seleccionadas para una evaluación hematológica. Esto es considerado como uno de los puntos críticos dentro de los factores preanalíticos establecidos por la Sociedad Americana de Patólogos Clínicos Veterinarios (ASVCP) en su Guía de Control de Calidad de Procedimientos de Laboratorio en especies mamíferas como no mamíferas (Vap *et al.*, 2012). La presencia de coágulos, elementos interferentes como la hemólisis en alto grado o un inadecuado almacenamiento son factores determinantes en el rechazo de una muestra. El proceso de toma de muestras en este estudio consideró disminuir al máximo posible el tiempo de extracción de sangre y mezcla con anticoagulante para evitar la

formación de coágulos que pudiesen afectar los recuentos celulares y la ejecución del frotis sanguíneo (Kreiberg, 2000; Hunn y Greer, 1991; Black, 2000). Se describe que aún cuando se utilice el anticoagulante de elección para la especie, la sangre puede igualmente coagular, o bien, es posible observar pequeños coágulos sólo visibles al microscopio (Hrubec *et al.*, 1996; Hrubec *et al.*, 2000; van Vliet *et al.*, 1985). Durante la toma de muestras no se observó coagulación en los tubos con heparina, pero sí la presencia de microcoágulos de al menos 5-7 trombocitos, de muy baja frecuencia en las muestras observadas, tanto en la cámara de Neubauer como en los frotis sanguíneos. Si bien no hay datos más exactos de frecuencia de aparición de la microcoagulación, es posible que este hecho no fuera un factor relevante al momento de analizar y comparar ambos métodos ya que es una situación esperada y considerada dentro de los posibles errores en la toma de muestra.

La sangre de los peces es altamente sensible a la hemólisis por lo que se recomienda la extracción de bajos volúmenes de sangre por ejemplar (1-3 mL), dependiendo de su tamaño y peso (Hrubec y Smith, 2010). A pesar de considerar un volumen adecuado se observaron distintos grados de hemólisis en las muestras obtenidas. De acuerdo a lo propuesto por Dugan *et al.* (2005) nuestro punto de corte para incluir una muestra fue hemólisis moderada (<200 mg/dL). Todas las muestras que estuvieron por sobre esta medición fueron excluidas del estudio. Una posible solución para evitar la hemólisis es utilizar la jeringa previamente heparinizada, tal como lo describe Black (2000), pero uno de los inconvenientes de realizar este procedimiento con bajos volúmenes de sangre es que existe la posibilidad de diluir la muestra si no se tiene la precisión en el llenado de la jeringa. Por ello y dadas las condiciones de muestreo en terreno no se utilizó esta opción ya que el tiempo considerado para la toma de muestras fue limitado y podría haber sido un componente de error en los recuentos celulares.

El procesamiento de muestras para estudios hematológicos en ejemplares no mamíferos (aves, reptiles y peces) tiene también limitantes como el transporte de las muestras debido a la fragilidad del tejido frente a agentes anticoagulantes. En aves se ha evidenciado un deterioro celular importante a las 12 horas posteriores a la toma de muestra de sangre, aún cuando ésta se encuentre refrigerada y con el anticoagulante de elección (Vap *et al.* 2012). En salmones esta etapa constituye un punto crítico, tal cual lo señala Roberts (1989), quien describe que este es otro problema técnico en el estudio hematológico de peces. En el presente estudio, el transporte se realizó de acuerdo a lo estipulado y en un tiempo menor debido a que las instalaciones del laboratorio local de Aquainnovo se encontraban cercanas al lugar de extracción de las muestras lo que permitió tener un mejor control sobre esta variable.

La confiabilidad de los recuentos celulares manuales es una de las mayores dificultades para el diagnóstico hematológico en peces (Hrubec y Smith, 2010; Cray y Zaias, 2004; Noro y Wittwer, 2011). Los recuentos deben realizarse manualmente debido a que los métodos automáticos no distinguen claramente tipos celulares por la semejanza de tamaños entre las células y la presencia de núcleos en trombocitos y eritrocitos. En cualquier especie el método manual de recuento celular tiene múltiples fuentes de error como la dilución y homogenización de la muestra, llenado de la cámara de Neubauer, identificación y recuento de células y el tiempo considerado en su realización (Jain, 1986; Vap *et al.*, 2012, Kjelgaard – Hansen y Lundorff Jensen, 2010). Sin embargo, en peces son la mejor opción y el método de elección es el recuento celular directo en cámara de Neubauer o método del Hemocitómetro (Hrubec y Smith, 2010; Cray y Zaias, 2004; Noro y Wittwer, 2011).

En el presente estudio se realizaron dos recuentos celulares directos por muestra a partir de los cuales se obtuvo un promedio para minimizar el error. Debido el tiempo requerido para realizar los recuentos y la cantidad de individuos a muestrear, se contempló en esta etapa el uso de un sistema de captura de imágenes de alta calidad y resolución conectado al microscopio óptico. De esta forma, se obtuvo imágenes de cada cámara en objetivo 10x, en las que posteriormente fueron realizados los recuentos con la imagen ampliada. En la tabla N°1 se puede observar que los recuentos celulares obtenidos en la cámara de Neubauer se encuentran dentro de los rangos esperados para leucocitos totales 4.000-25.000/uL (Hrubec y Smith, 2010; Noro y Wittwer, 2011). El coeficiente de variación de estos recuentos fue 28,4% y de acuerdo a algunos autores este resultado se puede explicar principalmente por la variación individual que poseen los salmones en sus parámetros sanguíneos (Anderson y Barney, 1991; Roberts, 1989). En el gráfico N°1 se observa la distribución de los datos y su dispersión en el plano que representa esta variación. Este resultado es semejante a lo descrito por Russo *et al.* (1986) quienes realizaron recuentos celulares con cámara de Neubauer en sangre de guacamayos, sin uso del sistema de captura de imágenes para comparar dos métodos de recuento de leucocitos totales. Estos autores obtuvieron un coeficiente de variación de 12%, lo cual representa un alto porcentaje de variabilidad, fundamentalmente si lo comparamos con los coeficientes de variación que habitualmente se obtienen en mamíferos domésticos, cercanos a rangos de 5-10% (Flatland *et al.*, 2010). De acuerdo a lo estipulado por Vap *et al.* (2012) los recuentos celulares manuales en individuos no mamíferos se encuentran en rangos de coeficiente de variación entre el 20-40% (Lumsden, 2000; Harr *et al.*, 2005), por lo tanto, es posible especular que al utilizar este método directo de recuento celular debemos esperar un grado de variabilidad mayor.

El aumento o disminución de la variación está ligado a varios factores, los principales serían factores provenientes del personal técnico que analiza la muestra, de la calidad de la muestra y del método propiamente tal. Todos esos factores fueron considerados en este estudio, pero hubo una variación de la metodología al no realizar los recuentos celulares directos “*in situ*” en la cámara de

Neubauer. Al modificar este paso por el uso de un sistema de captación de imágenes de alta resolución con la finalidad de disminuir el tiempo utilizado por muestra, es posible que haya sido un factor que aportó al incremento en la variabilidad en el resultado obtenido. Aun cuando no se encontró bibliografía relacionada con el uso de un sistema de captación de imágenes para realizar los recuentos celulares en cámara de Neubauer, una imagen de alta resolución tiene ciertas ventajas en términos del tiempo inmediato en la ejecución de los recuentos, pero no permite manipular adecuadamente el enfoque de la muestra, lo que sí es posible de hacer cuando se está operando directo en la cámara de Neubauer con el micrométrico. Además, es necesario recordar que en el recuento celular mediante el método del hemocitómetro, es preciso realizar identificación de algunas líneas celulares, como eritrocitos y leucocitos-trombocitos, los que dependiendo de su estado pueden aparecer poco distinguibles. Se pensó que la resolución del sistema fotográfico sería un aporte en este sentido, pero el poder enfocar manualmente en cada campo de observación permitiría una mejor discriminación de los tipos celulares. Esto podría marcar la diferencia y, por lo tanto, nuestro resultado pudo haber sido influenciado por la utilización de esta variación del método.

La realización de extendidos o frotis sanguíneos de buena calidad es otro punto crítico. Este concepto es difícil de definir, ya que se consideran variables como la experiencia, técnica, habilidad y calidad de la sangre, entre otros (Vap *et al.*, 2012; Flatland *et al.*, 2010). El objetivo es producir un extendido que contenga una buena distribución celular (especialmente de leucocitos) dentro del área de recuento que se caracteriza por ser una monocapa de células (Allison y Mainkoth, 2007). En este estudio se realizaron 3 frotis sanguíneos por muestra, y se escogieron los dos mejores para realizar los recuentos celulares. Al igual que con los recuentos realizados en la cámara de Neubauer, se obtuvo el promedio de dos frotis para disminuir el error.

Los recuentos celulares indirectos en frotis sanguíneo se realizaron de acuerdo al método propuesto por Walberg (2001) con una adaptación metodológica que permitió mantener la proporción de campos mínimos de recuento sin modificar la fórmula ni el factor, pero mejorando la precisión en la identificación de las células y por lo tanto la exactitud. El resultado obtenido mostró un coeficiente de variación mayor al observado en la cámara de Neubauer, alcanzando un 36,4%, lo que se encuentra muy cercano al máximo permitido para estos resultados. Si bien la literatura es poco concluyente respecto al uso de metodologías de recuento indirecto de células, existe concordancia en que la gran mayoría de ellas se debe a las imprecisiones propias de cada método, más aún cuando se trata de ejemplares no mamíferos (Vap *et al.*, 2012; Arnold, 1994; Dein *et al.*, 1994). Los recuentos celulares indirectos son extremadamente dependientes de una distribución uniforme de todas las células y de la ausencia de lisis en la muestra. Incluso hay autores que no recomiendan su uso en peces debido a su baja confiabilidad y repetitividad en los resultados

(Stoskopf, 1988). En especies menores, el uso de técnicas indirectas es más frecuente ya que se ha logrado establecer constantes de análisis y control de calidad de las estimaciones, aún cuando siempre se destaca la importancia de personal calificado y protocolos estandarizados en su ejecución (Twedten, 1994; Allison y Mainkoth, 2007). El resultado obtenido en el recuento indirecto de leucocitos, si bien tiene un amplio coeficiente de variación, éste aún se encuentra dentro del rango indicado por Vap *et al.* (2012), lo que sugiere que a partir del método propuesto por Walberg (2001) es posible obtener una estimación de leucocitos totales/ μL . El único factor que consideramos puede haber influido es la adaptación realizada a la fórmula detallada anteriormente, por lo que no podemos comprobar que esta metodología sea totalmente útil como recuento indirecto.

Debido a las diferencias estadísticamente significativas encontradas entre las medias de ambos recuentos se realizó una correlación para establecer si los datos presentaban algún grado de asociación, en otras palabras, si los resultados aumentan o disminuyen según la variable con la que se están midiendo. Los resultados se presentan en la tabla N°3, donde se observa una significativa pero baja correlación (0,23; $p < 0.05$) entre ambas mediciones. De acuerdo a la literatura (Twedten, 1994, Vap *et al.*, 2012; Flatland *et al.*, 2010; Lumsden, 2000) se considera aceptable para validar una técnica una correlación $\geq 0,80$ valor que no fue alcanzado en este estudio por lo que no es posible validar este método de recuento indirecto de células.

Conclusiones

1. El recuento celular directo de leucocitos en cámara de Neubauer presentó un coeficiente de variación cercano a la media dentro del rango descrito en la literatura y es consistente como método estándar para ser utilizado en salmones.
2. El uso de la metodología estándar en el recuento directo de células en cámara de Neubauer en conjunto con un sistema de captura de imágenes, podría ser una importante fuente de error que influyó negativamente en la variación obtenida, por lo que no sería recomendable utilizarla bajo este procedimiento.
3. La fórmula propuesta por Walberg (2001), presenta un coeficiente de variación alto pero dentro del rango descrito en la literatura, por lo que sería posible obtener una estimación de leucocitos totales/ μL en salmones. Sin embargo, debido a la adaptación de metodología realizada no es posible concluir que pueda ser un método indirecto confiable.
4. Se observa una significativa pero baja correlación entre las medias del recuento directo e indirecto, resultado que no es suficiente para poder validar esta metodología bajo las condiciones del presente estudio.
5. Debido a lo anterior, se propone realizar en futuros estudios los recuentos directos sin uso de un sistema de captura de imágenes y comparar la fórmula propuesta por Walberg (2001) sin una adaptación metodológica.
6. Por último, y dada la importancia que los leucocitos representan en el contexto inmunológico, también se plantea la necesidad de buscar nuevas estrategias para estimar de forma más confiable metodologías hematológicas en torno a los recuentos leucocitarios indirectos en salmones.

Bibliografía

- Allison, R.W., Mainkoth, J.H.** 2007. Hematology Without the Numbers: In-Clinic Blood Film Evaluation. *Vet Clin Small Anim* 37. Pp 245–266
- Anderson D.P., Barney P.J.** 1991. The Role of the diagnostic laboratory in fish disease control. *Annual Rev of Fish Diseases* Pp 41-62.
- Arnold J.** 1994. White blood cell count discrepancies in Atlantic loggerhead sea turtles: Natt-Herrick vs. Eosinophil Unopette. 14th Annual Conference, Cleveland, OH. *Assoc Zoo Vet Tech* Pp 15–26.
- Black, M.C.** 2000. Collection of Body Fluid. **En:** Ostrander, G.K. *The Laboratory Fish*. 1° Ed. Londres. Reino Unido. Academic Press Pp 498-501.
- Blaxhall P.C.** 1972. The haematological assessment of the health of freshwater fish – A review of selected literature. *J Fish Biol* 4: 593–604.
- Burka J.F., Hammell K.L., Horsberg E.T., Johnsons G.R., Rainnie D.J., Speare D.J.** 1997. Drugs in salmonid aquaculture - A review, *J Vet Pharmacol Therap* Vol. 20. Pp 333-349.
- Campbel T.W.** 2010. Hematology of Psittacines. **En:** Weiss, D.J., Wardrop K.J. *Veterinary Hematology*. 6° edición. Iowa. USA. Wiley-Blackwell. Pp 968-976.
- Casillas E., Smith L.S.** 1977. Effect of stress on blood coagulation and hematology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J Fish Biol* 10: 481–491.
- Clark P., Boardman W., Raidal S.** 2009. Atlas of Clinical Avian Hematology, 1° edition. Oxford. United Kingdom. Ed Wiley-Blackwell. Pp 32.
- Clauss T.M., Dove A.D.M., Arnold J.E.** 2008. Hematologic Disorders of Fish. *Veterinary Clinics Exotic Animal*. Vol. 11. Pp 445-462.
- Cray C., Zaias J.** 2004. Laboratory procedures. *Veterinary Clinics Exotic Animal Practice*. Vol. 7, Pp 487-518.
- Dein F.J., Wilson A., Fischer D., Langenberg J.** 1994. Avian leucocyte counting using the hemocytometer. *J Zoo Wild Anim Med* 25:432–437.
- Di Rienzo J.A., Casnoves F., Balzarini M.G., González L., Tablada M. Robledo C.W.** 2008. InfoStat. Versión 2008. Grupo InfoStat. FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina
- Dugan L., Leech L., Speroni K.G., Corriher J.** 2005. Factors Affecting Hemolysis Rates in Blood Samples Drawn From Newly Placed IV Site in the Emergency Department. *J Emerg Nurs* Vol 31. Pp 338-345.
- Fänge, R.** 1992. Fish Blood Cell **En:** Hoar, W.S., Randall, D.J., Farrell, A.P. *Fish Physiology*. 1° Ed. Londres. Reino Unido. Academic Press. Volumen XXI, Parte B. Pp 2-46.
- Farrell, A.P.** 2011. Circulation. **En:** *Encyclopedia of Fish Physiology*. 1° Ed. Londres. UK. Editorial Elsevier. Vol. 1, Pp 984-997.

Flatland B., Freeman K.P., Friedrichs K.R., et al. 2010. ASVCP quality assurance guidelines: control of general analytical factors in veterinary laboratories. *Vet Clin Pathol* 39:264–277.

Hardie L.J., Fletcher T.C., Secombes C.J. 1991. The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Elsevier. *Aquacultures*. Vol 95, issue 3-4. Pp 201-214.

Harr K.E., Raskin R., Heard D.J. 2005. Temporal effects of 3 commonly used anticoagulants on hematologic and biochemical variables in blood samples from macaws and Burmese pythons. *Vet Clin Pathol* 34:383–388.

Hille S. 1982. A literature review of blood chemistry of Rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J of Fish Biol* Vol 20. Pp 535-569.

Hrubec T.C., Smith S.A., Robertson J.L., et al. 1996. Comparison of hematologic reference intervals between culture system and type of hybrid striped bass. *Am J Vet Res* 57 : 618–623 .

Hrubec T.C., Cardinale J.L., Smith S.A. 2000. Haematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis* hybrid) . *Vet Clin Pathol* 29 : 7–12 .

Hrubec T.C., Smith S.A. 2010. Hematology of Fishes. **En:** Weiss, D.J., Wardrop K.J. Schalm's Veterinary Hematology. 6° edición. Iowa. USA. Wiley-Blackwell. Pp 994-1003.

Hunn J.B., Greer E.I. 1991. Influence of Sampling on the Blood Chemistry of Atlantic Salmon. The Progressive Fish-Culturist. Vol. 53. Pp 184-187.

Jain, N.C. 1986. Schalm's Veterinary Hematology. 4th ed. Lea and Febiger, Philadelphia, USA.

Kjelgaard – Hansen M., Lundorff Jensen A. 2010. Quality control. **En:** Weiss, D.J., Wardrop K.J. Schalm's Veterinary Hematology. 6° edición. Iowa. USA. Wiley-Blackwell. Pp 1021-1026.

Korcock D.E., Houston A.H., Gray J.D. 1988. Effects of sampling conditions on selected blood variables of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J Fish Biol* Vol. 33. Pp 319-330.

Kreigberg H. 2000. Stress and Anesthesia . **En:** Ostrander G. K. The Laboratory Fish. 1° edición. Londres. Reino Unido. Academic Press. Pp 503-509.

Latimer K., Bienzele D. 2010. Determination and Interpretation of the Avian Leukogram. **En:** Weiss D., Wardrop K. Veterinary Hematology. 6° edition. Iowa. USA. Ed Wiley-Blackwell. Pp 345-346.

Leonardi M., Klempau A. 2003. Artificial Photoperiod Influence on the Immune System of Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, Vol 221. Pp 581-591.

Lumsden J.H. 2000. Quality control. **En:** Feldman B.F., Zinkl J.G., Jain N.C., eds. Schalm's Veterinary Hematology. 5th ed. Baltimore, MD: Lippincott, William & Wilkins; Pp16–19.

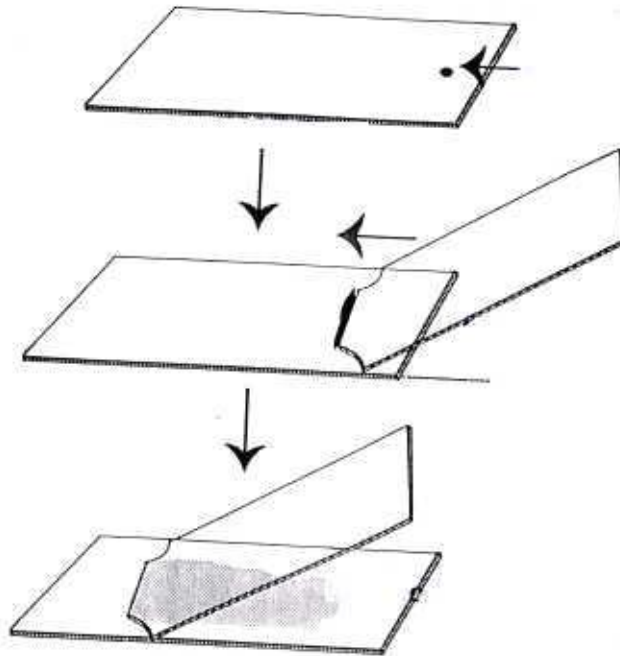
- Maule A.G., Schreck C.B.** 1990. Changes in Numbers of Leukocytes in Immune Organs of Juvenile Coho Salmo after Acute Stress or Cortisol Treatment. *Journal of Aquatic Animal Health*. Vol. 2. Pp 298-304.
- Morera D., MacKenzie S.A.** 2011. Is there a direct role for erythrocytes in the immune response?. *Veterinary Research*. Vol 42. Pp 89.
- Morera D., Roher N., Ribas L., Balasch J. C., Doñate C., Callol A., Boltaña S., Roberts S., Goetz G., Goetz F. W., MacKenzie S. A.** 2011. RNA-Seq Reveals an Integrated Immune Response in Nucleated Erythrocytes. *PloSONE*. Vol 6. Pp 10.
- Natt M.P., Herrick C.** 1952. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leukocytes of the chicken. *Poult Sci*. Vol. 31. Pp 735–738 .
- Noro M., Wittwer F.** 2012. *Hematología de Salmonideos*. Imprenta Master Print Ltda. Valdivia. Chile. Pp 45.
- Rehulka J., Minarik B., Rehulková E.** 2004. Red Blood cell indices of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in aquaculture. *Aquaculture Research*. Vol. 35. Pp 529-546.
- Roberts R.J.**, 1989. *Fish Pathology*. 2nd Ed. London. Saunder Company. Pp 374-405.
- Russo E.A., McEntee L., Applegate L., Baker J.S.** 1986. Comparison of two methods for determination of white blood cell counts in macaws. *JAVMA*. Vol 189. Pp 1013-1016.
- Stoskopf, M.** 1993. *Clinical Pathology*. En: *Fish Medicine* Ed by M.Stoskopf. W.B. Saunders, Philadelphia. Pp: 113-131.
- Tvedten H.** 1994. *The Complete Blood Count and Bone Marrow Examination: General Comments and Selected Techniques*. En: Willad M.D., Tvedten H., Turnwald G.H. *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*. 2nd Ed. Pennsylvania. Philadelphia. Estados Unidos. Sanders. Pp 20-26.
- Van Vliet K.J., Smit G.L., Pieterse J.J., et al.** 1985. Thrombelastographic diagnosis of blood coagulation in two freshwater fish species. *Comp Biochem Physiol A* 82 : 19 – 21 .
- Vap L.M., Harr K.E., Arnold J.E., Freeman K.P., Getzy K., Lester S., Friedrichs K.R.** 2012. ASVCP quality assurance guidelines: control of preanalytical and analytical factors for hematology for mammalian and nonmammalian species, hemostasis, and crossmatching in veterinary laboratories. *Vet Clin Pathol* Vol 41. Pp 8-17.
- Walberg J.** 2001. White Blood Cell Counting Techniques in Bird. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. Vol 10. Pp. 72-76.
- Yasutake T.W., Wales J.H.** 1983. *Microscopic Anatomy of Salmonids: An Atlas*. Resource Publication 150. Washington D.C. Estados Unidos. Pp 82-83.

Anexos

Anexo 1: FROTIS SANGUÍNEO

Método del Portaobjeto

1. Tomar un portaobjeto limpio entre los dedos pulgar y medio.
2. Limpiar con el pincel.
3. Colocar en uno de los extremos una gota pequeña de sangre previamente mezclada con el anticoagulante o directa desde la toma de muestra.
4. Realizar la extensión con otro portaobjeto de canto perfectamente liso, de manera de correrlo por delante de la gota hasta tomar contacto con ella, ésta se extiende por el borde del portaobjeto extensor y éste se desliza hacia adelante suavemente. El ángulo del portaobjeto determina el grosor de la película. Resulta satisfactorio un ángulo de 30°.
5. Secar al calor del mechero o al aire.



Anexo 2 : TINCIÓN GIEMSA

Material

1. Vasos Coplin, corcho o tapón de goma.
2. Solución comercial concentrada de Giemsa.
3. Buffer fosfato pH 6,9.

Procedimiento

1. Cubrir los frotis secos (en cobre o porta) con alcohol metílico absoluto por 3 a 5 minutos. Verter el excedente y luego secar al aire (fijación frotis).
2. Preparar colorante Giemsa diluido (fresco), en la siguiente proporción: 1 mL de buffer fosfato pH 6,9 por 2 gotas de solución Giemsa.
3. Para estudio de rutina dejar en el colorante 15'.
4. Botar el excedente, lavar en agua corriente suave y dejar secar a temperatura

Anexo 3 : RECUESTO CÁMARA DE NEUBAUER

Material

1. diluyente de Natt-Herrick
2. micropipeta 1000, 10 y 20 μ L
3. puntas azules y amarillas
4. tubos eppendorf 1,5 mL
5. Pipeta Pasteur
6. Microscopio óptico

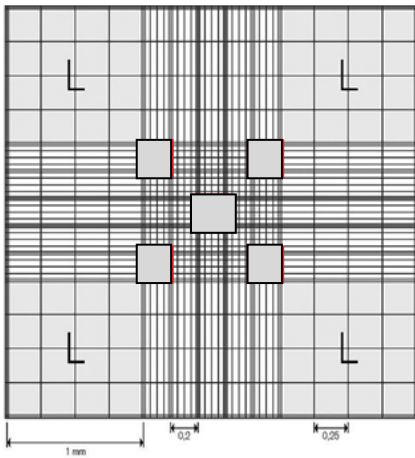
Procedimiento

1. Colocar 990 μ L de diluyente dentro de un tubo eppendorf.
2. Adicionar 10 μ L de sangre previa limpieza de la punta para evitar exceso de sangre en la dilución.
3. Mezclar la sangre durante unos 2 minutos con el diluyente y dejar por 4 minutos.
4. Mezclar nuevamente y sacar con pipeta Pasteur una cantidad para llenar la cámara de Neubauer en ambos lados. Cubrir con cubrecámara o cubreobjeto.
5. Dejar la cámara de Neubauer en el microscopio por aproximadamente 1 a 2 minutos para que las células se asienten.
6. Contar las células.
7. Lavar la cámara con agua destilada, pasar por alcohol éter, secar y guardar.

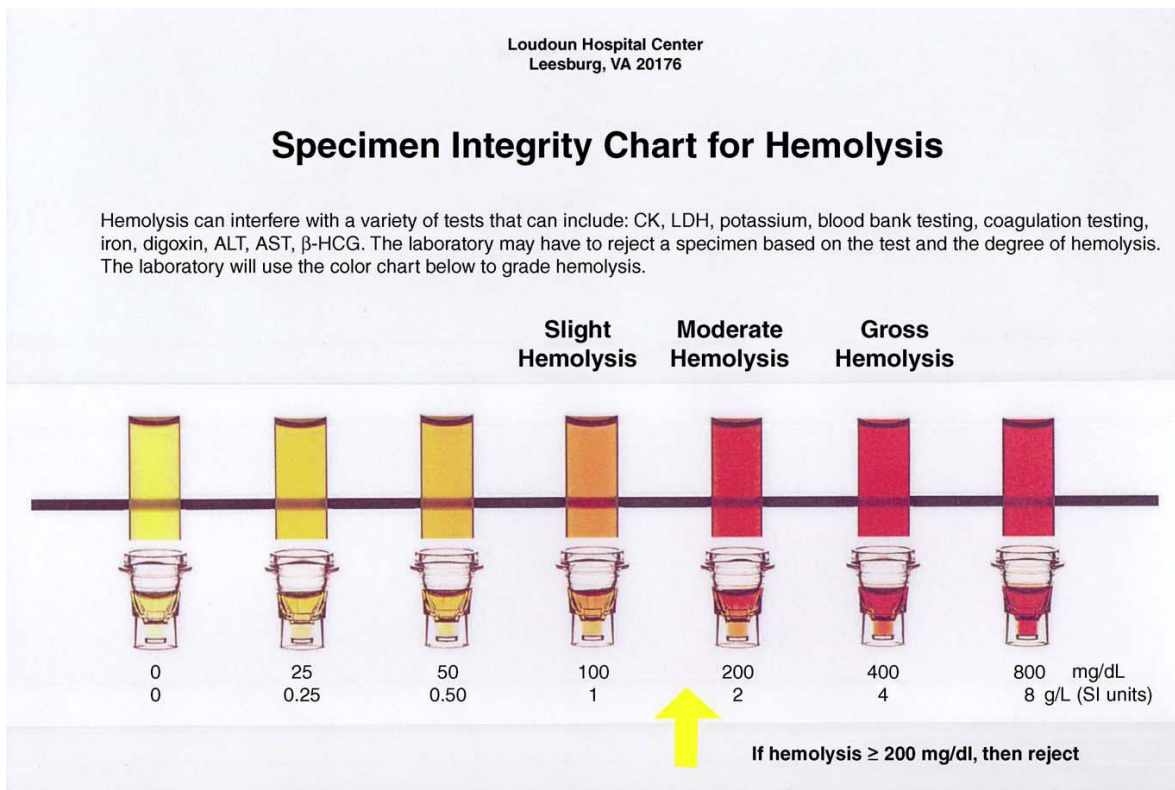
Pauta general de cuenta de células

1. Ubicar en la cámara la superficie correspondiente para el recuento de eritrocitos o leucocitos. (Figura N°3).
2. Comenzar el recuento en el cuadrado superior izquierdo incluyendo todas las células ubicadas en los bordes superior e izquierdo.

3. Seguir el recuento en los demás cuadrados, L para recuento leucocitario y trombocitario, y recuadros Rojos para el recuento de eritrocitos.



Anexo 4 : TABLA DE DESCARTE POR GRADO DE HEMOLISIS (Dungan *et al.*, 2005).



Anexo 5 : Adaptación metodológica de campos de recuento en frotis sanguíneo

Con la finalidad de estimar la equivalencia entre los objetivos de aumento mayor (400x) y objetivo de inmersión (1000x) se realizó un cálculo del área de cada uno de los objetivos mediante el uso de fotografías. Todas fueron estandarizadas a la misma escala para luego obtener una relación entre áreas:

-área de aumento mayor fue de 186 cm²

-área de aumento de inmersión fue de 38,5 cm²

-relación entre áreas 4,83 campos de inmersión en un campo de aumento mayor

Para comprobar la relación de áreas se realizó el recuento de leucocitos en 10 muestras tomadas al azar. Se efectuaron 2 repeticiones por muestra para cada objetivo y se obtuvo el promedio:

N° Muestra	Promedio 400x	Promedio 1000x
10156	80	85
10128	65	68
10118	87	66
10150	74	67
10127	80	65
10132	59	41
10162	71	70
10126	78	71
10124	76	74
10130	67	68

Para ver si existían diferencias estadísticas entre las medias obtenidas de cada muestra bajo la relación de número de campos equivalentes, se efectuó una comparación de medias. El resultado fue que no hubo diferencias significativas ($p=0,0594$) por lo que la relación obtenida pudo ser utilizada sin variar la fórmula de Walberg (2001):

Obs(1)	Obs(2)	N	Media(dif)	Media(1)	Media(2)	T	(p)Bilateral
400x	1000x	10	6,20	73,70	67,50	2,16	0,0594

($p \leq 0,001$)