



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**CUENTA DE LEUCOCITOS EN FROTIS SANGUÍNEO COMO  
ALTERNATIVA DE CAMPO AL MÉTODO DEL  
HEMOCITÓMETRO EN ESPECÍMENES DE TRUCHA ARCOÍRIS  
(*Oncorhynchus mykiss*) CLÍNICAMENTE SANOS**

**PABLO ANDRÉS SALGADO SCHÜLER**

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

PROFESOR GUÍA: ANA MARÍA RAMÍREZ KAMANN

Universidad de Chile

CORFO Sanitario (2009-6682)

SANTIAGO, CHILE

2017



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**CUENTA DE LEUCOCITOS EN FROTIS SANGUÍNEO COMO  
ALTERNATIVA DE CAMPO AL MÉTODO DEL  
HEMOCITÓMETRO EN ESPECÍMENES DE TRUCHA ARCOÍRIS  
(*Oncorhynchus mykiss*) CLÍNICAMENTE SANOS**

**PABLO ANDRÉS SALGADO SCHÜLER**

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

NOTA FINAL:.....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: ANA MARÍA RAMÍREZ KAMANN	.....	.....
PROFESOR CORRECTOR: PEDRO A. SMITH SCHUSTER	.....	.....
PROFESOR CORRECTOR: JURIJ M. WACYK GONZÁLEZ	.....	.....

Universidad de Chile

CORFO sanitario (2009-6682)

SANTIAGO, CHILE

2017

## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial a la Dra. Ana María Ramírez K., por aceptarme para realizar esta memoria de título bajo su guía. Por su orientación, seguimiento y supervisión continúa de esta investigación, pero por sobre todo por la motivación y la calidad humana que demostró en el desarrollo de este proceso.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento a los profesores correctores, el profesor Jurij M. Wacyk G. por incluirme en el equipo que se encontraba trabajando bajo su tutela. Por su importante aporte y participación activa en el desarrollo de este trabajo. De la misma forma, me gustaría agradecer al Dr. Pedro A. Smith S. por facilitar la utilización de las instalaciones de la Unidad Experimental de Animales Acuáticos, y también por la buena disposición a entregar sugerencias y correcciones a la investigación.

No cabe duda que la participación de todos los docentes involucrados ha enriquecido el trabajo realizado, como también mi formación como profesional.

Al Dr. Guido Véliz, que en el comienzo de mi investigación como compañero y amigo compartió sus conocimientos teóricos y prácticos.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a todas las personas que trabajan en el Departamento de Patología Animal, en especial a la Dra. Lorena Aguilar, Dra. Francisca Benito y Jacqueline Yevenes por sus aportes, sugerencias y sobretodo el buen trato recibido.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de mi familia, en especial a mi madre Claudia, a Rosita, a mis abuelos paternos que viven en nuestros recuerdos y a mis amigos. Quienes, que de una u otra forma me acompañaron a lo largo de este proceso de formación profesional.

A todos ellos, muchas gracias.

## **ÍNDICE**

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>SUMMARY</b> .....	3
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	4
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	5
Aspectos de la producción .....	5
Importancia del diagnóstico hematológico .....	6
Sangre.....	7
Análisis hematológico .....	9
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	14
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	14
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	15
Individuos.....	15
Toma de muestra.....	15
Procesamiento de las muestras.....	17
Frotis sanguíneo: ejecución y tinción.....	17
Recuento directo de leucocitos por el método del Hemocitómetro.....	17
Selección de frotis sanguíneo.....	18
Estudio celular diferencial en el frotis sanguíneo.....	18
Recuento indirecto de leucocitos en el frotis sanguíneo.....	18
Análisis estadístico.....	19

<b>RESULTADOS</b> .....	20
Número total de leucocitos obtenidos mediante el método del hemocitómetro en individuos de trucha arcoíris clínicamente sanos.....	20
Número total de leucocitos obtenidos mediante el método del frotis sanguíneo en individuos de trucha arcoíris clínicamente sanos.....	23
Correlación entre ambos métodos de recuento de leucocitos totales.....	26
<b>DISCUSIÓN</b> .....	28
<b>CONCLUSIONES</b> .....	39
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	40
<b>ANEXOS</b> .....	46
Anexo 1: Protocolo de traslado de peces.....	46
Anexo 2: Frotis sanguíneo método del portaobjeto.....	47
Anexo 3: Recuento directo cámara de Neubauer.....	48
Anexo 4: Medidas de resumen según método de recuento celular.....	51
Anexo 5: Gráficos de dispersión independientes para las variables CN y FS.....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### Figuras

Figura 1. Imagen de cuadrante primario en cámara de Neubauer.....	22
Figura 2. Imagen de cuadrante secundario en cámara de Neubauer.....	22
Figura 3. Imagen de área de recuento de leucocitos en cámara de Neubauer (10x).....	24
Figura 4. Imagen de área de recuento de leucocitos en cámara de Neubauer (40x).....	24
Figura 5. Imagen de área de recuento de leucocitos en cámara de Neubauer, observación de trombocito.....	25
Figura 6. Imagen de área de recuento de leucocitos en cámara de Neubauer, observación de leucocito.....	25

### Tablas

Tabla N°1. Esquema de muestreo de trucha arcoíris.....	16
Tabla N°2. Recuentos totales de leucocitos en cámara de Neubauer expresado en N° de Leucocitos totales/ $\mu$ L.....	21
Tabla N°3. Recuentos totales de leucocitos en frotis sanguíneo expresado en N° de Leucocitos totales/ $\mu$ L.....	23
Tabla N°4. Prueba de Shapiro-Wilks para las variables RTL-CN y RTL-FS.....	26
Tabla N°5. Resultados de la correlación de Spearman entre RTL-CN y RTL-FS.....	27

## RESUMEN

La hematología ha mostrado ser una buena herramienta para apoyar al diagnóstico de diversas condiciones en animales. En peces destinados a producción, es necesario estudiar y estandarizar las metodologías para obtener parámetros sanguíneos y así contar con indicadores que aporten al control sanitario. El recuento de leucocitos totales otorga información en relación al estatus inmunológico, pero los métodos validados representan cierta dificultad al momento de su uso en terreno ya que requieren implementos de laboratorio y personal calificado para su ejecución. Por ello, el objetivo principal fue establecer un método de recuento indirecto de leucocitos totales en frotis sanguíneo en individuos de trucha arcoíris clínicamente sanos, como alternativa al método estándar utilizado comúnmente en laboratorio.

En dos muestreos separados por 2 semanas se obtuvo muestras de sangre en tubos con heparina litio de 54 ejemplares de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) procedentes de la piscicultura Río Blanco, Quinta región. A cada muestra se le realizaron recuentos totales de leucocitos mediante el método directo del hemocitómetro en cámara de Neubauer (RTL-CN) y recuentos totales de leucocitos por método indirecto en frotis sanguíneo (RTL-FS). El promedio de recuento en RTL-CN fue 19.499 leucocitos/ $\mu$ L con coeficiente de variación (CV) de 47,88%. El promedio de recuento en RTL-FS fue 43.552 leucocitos/ $\mu$ L con coeficiente de variación de 32,18%. Estos resultados muestran un menor coeficiente de variación en el recuento indirecto (RTL-FS) lo que podría deberse a la rigurosidad con que se trabajó la preanalítica y analítica del método, condiciones que son puntos críticos en la ejecución de los recuentos celulares. La correlación entre ambos métodos fue de 0,65 ( $p < 0,0001$ ) positiva y estadísticamente significativa, pero no suficiente para validar el recuento indirecto según lo sugerido por la literatura ( $\geq 0,80$ ) aún cuando es más alta que la obtenida por Veliz (2013) bajo la misma metodología, lo que sugiere la posibilidad de ser utilizada en estimaciones de leucocitos.

Basado en lo anterior, se postuló un modelo matemático predictor de valores promedio de recuento de leucocitos en cámara de Neubauer a partir de recuentos de leucocitos realizados en frotis sanguíneo. De acuerdo a lo referido hasta ahora en la literatura, este sería el primer modelo matemático descrito con el objetivo principal de generar una herramienta de apoyo

al diagnóstico que pueda ser utilizada en el monitoreo de leucocitos totales en peces a nivel de terreno.

Palabras clave: *cámara de Neubauer, trucha arcoíris, recuento total de leucocitos, método indirecto.*

## SUMMARY

Hematology has shown to be very useful as a diagnostic approach tool in several animal conditions. Particularly, in fish culture species is necessary to study and standardize methodologies in order to obtain reliable blood parameters to assess sanitary control. White blood cell (WBC) counts bring relevant information of the immunologic status in fish, but validated laboratory methods are time consuming and require qualified people to develop them. The aim of this study was to establish an indirect WBC count in blood smears as an alternative method to the hemocytometer in Neubauer chamber.

Fifty four rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) specimens from Río Blanco fish farm, located in the Fifth Region, were sampled twice separated by 2 weeks. In each fresh blood sample WBC counts were performed by a direct hemocytometer method in Neubauer chamber (RTL-CN) and by an indirect method in blood smears (RTL-FS). The average count in RTL-CN was 19,499 leucocytes/ $\mu$ L with a variation coefficient (CV) of 47.88%. The average count in RTL-FS was 43,552 leucocytes/ $\mu$ L with a variation coefficient of 32.18%. This results show a less CV in the indirect method (RTL-FS) which may be explained by the accuracy in preanalytic and analytic work, requirements that are essential and critical in manual cell counts. The correlation between both methods was 0.65 ( $p < 0,0001$ ) positive and statistically significant, higher than the one obtained in a similar study (Veliz, 2013), but not enough to be validated, although it suggests the indirect method could be used in leucocyte estimations in blood smears.

Based on the above and other statistical information obtained in this work, we propose a mathematical predictive model of WBC counts obtained by means of smear leucocyte counts, which in our understanding, is the first screening hematological tool for fish leucocytes.

Key words: *Neubauer chamber, fish leucocytes, rainbow trout, WBC, indirect method*

## **INTRODUCCIÓN**

La hematología veterinaria ha mostrado ser una valiosa herramienta diagnóstica para evaluar la condición de salud en animales ya que son indicadores confiables de cambios fisiológicos y patológicos.

A diferencia de los mamíferos, la hematología diagnóstica en peces ha tenido su mayor desarrollo durante las últimas 2 décadas debido a algunas circunstancias que la hacen más desafiante. La gran cantidad de especies y diversidad ecológica junto con algunas diferencias en relación con la morfología y función de las células sanguíneas, sumado a limitaciones técnicas de recuento celular, crean un complejo escenario para su uso en el diagnóstico.

En peces con fines productivos, cuando se debe tomar una muestra de sangre a una gran cantidad de individuos, es altamente probable que ocurra distorsión y deterioro celular lo que afecta en gran medida la precisión analítica de los resultados al hemograma. Por ello, es necesario perfeccionar los métodos de análisis sanguíneo, en particular aquellos relacionados con los recuentos celulares, ya que se efectúan de forma manual y no mediante el uso de equipos automatizados, debido a la presencia de eritrocitos y trombocitos nucleados junto con los leucocitos.

De acuerdo a lo anterior, el objetivo principal de este estudio fue investigar la posibilidad de instaurar un método manual indirecto de recuento de células leucocitarias en trucha arcoíris como una alternativa de campo en la obtención de parámetros y características hematológicas confiables y compararlo con el método estándar de recuento celular directo realizado mediante hemocitometría.

## **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **Aspectos de la producción**

De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2016), la producción acuícola mundial de peces representó el 44,1% de la producción total de la pesca de captura y la acuicultura en 2014, un cifra superior al 42,1% alcanzado en 2012 y al 31,1% registrado en 2004. Estas cifras evidencian el notable crecimiento de la industria en los últimos años, explicado principalmente por el aumento en el cultivo de peces sobre otras especies acuícolas.

La proporción del salmón y la trucha en el comercio mundial de pesca y acuicultura ha registrado un fuerte incremento en los últimos 20 años, hasta el punto que, considerados en conjunto, en 2013 pasaron a ser el producto individual más importante en términos de valor comercial para la industria acuícola (FAO, 2016). La demanda de salmón cultivado ha crecido de forma sostenida en los últimos años y Chile sigue siendo el segundo productor y exportador mundial de salmón después de Noruega (FAO, 2016).

En los últimos 50 años, el consumo mundial de pescado *per cápita* se ha duplicado, pasando de 10 Kg en la década de 1960 a 20 Kg en la última década (FAO, 2016).

La comunidad internacional ha adquirido compromisos sin precedentes con el fin de enfrentar uno de los mayores desafíos del siglo XXI: cómo alimentar a más de 9.500 millones de personas para el año 2050 en un contexto de cambio climático, incertidumbre económica y financiera, y aumento de la competencia por los recursos naturales (FAO, 2016).

Por la importancia de la industria acuícola, el crecimiento sostenido de la demanda comercial de peces a través de los años y el desafío de cubrir necesidades alimentarias en un futuro, es necesario contar con sistemas acuícolas que sean sostenibles en el tiempo. Existe un acuerdo general en la Organización de las Naciones Unidas (ONU) en que la sostenibilidad consiste en seguir manteniendo los beneficios para la sociedad que los sistemas naturales proporcionan a largo plazo (FAO, 2016).

El buen estado sanitario en los sistemas de producción, resulta fundamental para el bienestar y rendimiento óptimo de los peces, siendo el control de las enfermedades, parte esencial en

un programa de gestión. La intensificación de las producciones aumenta la incidencia de las enfermedades propias de la especie, con lo cual también aumenta el uso de medicamentos veterinarios. Por ello su uso debe estar orientado a proteger la salud y bienestar de los animales, asegurando además, que los alimentos que se originan de los animales tratados sean inocuos para la población humana. Se debe considerar todas las medidas que sean necesarias para que estos fármacos no causen daño en el medio ambiente terrestre y acuático, de tal forma de disminuir el impacto que a futuro se puedan provocar en el ambiente (San Martín *et al.*, 2014).

Las actividades que ayuden a la detección, prevención, control y erradicación de enfermedades de animales acuáticos son claves para asegurar que el sistema productivo sea sostenible en el tiempo. En este contexto, el desarrollo de la medicina poblacional ha contribuido a salvaguardar el estado sanitario de los sistemas productivos, centrando su actividad en la detección y prevención de enfermedades. Dentro de la medicina poblacional, existen herramientas que ayudan a diagnosticar estados patológicos. Una de ellas es la hematología, útil en el análisis de situaciones que se pueden presentar en poblaciones numerosas de animales (Buenaño, 2010).

### **Importancia del diagnóstico hematológico**

Las técnicas hematológicas desarrolladas para mamíferos se pueden utilizar en los peces con ciertas modificaciones debido a características propias de este último grupo de vertebrados, y que también comparten con aves, reptiles y anfibios (Hrubec y Smith, 2010).

Medir parámetros sanguíneos en especies productivas, orienta en la identificación del estado sanitario de los animales, y en la efectividad del control de enfermedades infecciosas. También puede ayudar a detectar desbalances nutricionales y otros estresores que se pueden presentar durante el proceso de cultivos de peces (Buenaño, 2010). Lo anterior es importante ya que los sistemas productivos intensivos requieren mantener el control a niveles que permita sostener el equilibrio entre productividad y salud.

En ictiopatología el perfil hematológico se utiliza con fines de diagnóstico y control de individuos sanos en especies de cultivo. El análisis de parámetros hematológicos, como la concentración de hemoglobina, el hematocrito, recuento celular y la fórmula diferencial de

leucocitos entregan información sobre el estado general del pez, su respuesta a estados infecciosos bacterianos y virales, parasitosis y evolución de variadas patologías (Wittwer, 2012).

## **Sangre**

La sangre es un tejido constituido por una matriz líquida, el plasma, en la cual están suspendidos los elementos celulares. Su volumen en animales domésticos fluctúa entre el 6% a 11% del peso corporal, siendo mayor en los animales jóvenes. Es así que un pez de 1 Kg de peso contiene entre 60 a 110 mL de sangre con un contenido celular de 35 a 60% (Wittwer, 2012).

Los componentes celulares de la sangre son: eritrocitos, leucocitos y trombocitos. Dentro de los leucocitos podemos diferenciar los basófilos, eosinófilos, heterófilos, linfocitos y monocitos (Wittwer, 2012).

Los eritrocitos son las células más abundantes de la sangre. Su principal función es el transporte e intercambio de oxígeno y dióxido de carbono, pero también se les han atribuido otras funciones relacionadas con procesos biológicos diferentes al transporte de gases. Los eritrocitos de los peces a diferencia de los mamíferos conservan su núcleo. Existen estudios que han demostrado que los eritrocitos de vertebrados no mamíferos contienen en el núcleo cromatina (material genético de la célula: ADN y proteínas) condensada y descondensada, y en el citoplasma presentan la maquinaria necesaria para poder traducir el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) a proteína. Los eritrocitos de trucha arcoíris contienen ARNm que codifica para proteínas que tienen función de receptores de reconocimiento de patógenos, citoquinas o proteínas de fase aguda, todas ellas relacionadas con la respuesta inmune. Esto indicaría que los eritrocitos nucleados podrían jugar un papel activo en la respuesta inmunitaria en los peces (Morera *et al.*, 2011).

Los trombocitos son células sanguíneas nucleadas, su rol principal es participar en la hemostasia primaria similar a la desarrollada por las plaquetas en los mamíferos (Wittwer, 2012), activándose por los mismos mecanismos que las plaquetas de mamíferos (Hrubic y Smith, 2010). Existe evidencia de que los trombocitos de peces también desempeñan una función similar a la fagocitosis, la cual podría tener un rol funcional en la respuesta inmune

innata de los peces, además almacenan moléculas asociadas con el sistema inmunitario en sus gránulos, que tras la activación, expresan receptores adhesivos e inmunes en su superficie, y liberan mediadores solubles tales como quimiocinas, citoquinas y péptidos antimicrobianos (Esteban *et al.*, 2015).

Los linfocitos se encuentran en mayor proporción en los peces describiéndose valores entre 40% a 77% de los leucocitos totales (Wittwer, 2012). La mayoría de los linfocitos son producidos en el pronefro y en el timo (Olabuenaga, 2000). Actúan en la respuesta inmune innata y adaptativa (Hrubec y Smith, 2010), con al menos dos sub-poblaciones funcionales; los linfocitos T son responsables de la inmunidad mediada por células, los linfocitos B son responsables de la respuesta inmune humoral con la producción de anticuerpos (Wittwer, 2012). La inmunidad mediada por células es el sistema de defensa innato de los peces, el que poseen desde el nacimiento, los anticuerpos actúan a través de reconocimiento específico del antígeno, y la edad a la cual tiene una respuesta humoral completa varía entre los dos a diez meses después de la eclosión (Olabuenaga, 2000).

Las células productoras de anticuerpos o inmunoglobulinas derivan de los linfocitos B, los cuales por interacción con el antígeno se transforman en células plasmáticas, las cuales se pueden encontrar en el tejido conectivo, bazo, riñón y en la sangre. Se originan de las células B activadas por el antígeno y son consideradas las principales productoras de inmunoglobulinas (Olabuenaga, 2000).

Los linfocitos T son responsables de la inmunidad mediada por células, ésta respuesta recluta otros tipos celulares como son los macrófagos. En una estimulación antigénica primaria la población de linfocitos T se diferencia en distintos tipos celulares con funciones específicas. Estos incluyen, las células citotóxicas o “*killer*”, las que ejercen una citotoxicidad inespecífica de diferentes células blanco sin un previo reconocimiento, capaces de lisar células extrañas por contacto físico directo entre la célula T y la célula blanco; las células supresoras que regulan la producción de anticuerpos y de linfoquinas proporcionando un cierre al proceso y las células colaboradoras o “*helper*”, que ayudan a las células productoras de anticuerpos y también liberan ante la estimulación antigénica factores solubles o linfoquinas que aumentan la capacidad de defensa (Olabuenaga, 2000).

Los heterófilos son similares a los neutrófilos en los mamíferos y representan entre 2% a 25% del total de leucocitos en peces (Wittwer, 2012). Participan en la respuesta inflamatoria, en su citoplasma contienen gránulos lisosomales, los cuales contienen enzimas, por lo que su rol primario es la de provocar lisis extracelular (Olabuenaga, 2000) y también se describe una función secundaria de fagocitosis (Hrubec y Smith, 2010).

Los monocitos representan entre un 0 a 3% del total de leucocitos en peces y al igual que en los mamíferos, tienen corta vida media en sangre, migrando a los tejidos donde se establecen como macrófagos (Wittwer, 2012). Los macrófagos son células muy activas en fagocitosis que se encuentran en tejidos y en las cavidades peritoneal y pericárdica; en peces son especialmente abundantes en el bazo y en el tejido renal, también se pueden encontrar en mucosas (Olabuenaga, 2000).

Los eosinófilos representan entre un 0% y 1% del total de leucocitos (Wittwer, 2012), estas células participan en la destrucción de parásitos internos y en la modulación de reacciones alérgicas e inflamatorias (Hrubec y Smith, 2010). Los basófilos representan entre 0% a 1% del total de leucocitos (Wittwer, 2012), son raramente descritos en peces, lo que se podría deber a un número bajo o a que su morfología no sea bien conservada con los fijadores y tinciones comúnmente utilizadas, tienen la capacidad de digerir microorganismos (Hrubec y Smith, 2010).

### **Análisis hematológico**

Toda muestra de sangre que deba ser sometida a un estudio hematológico debe estar mezclada con un anticoagulante. En mamíferos, el anticoagulante de elección es el EDTA (Ácido Etilendiamino Tetracético) que es el que mejor conserva las características morfológicas por 20 a 24 horas y permite la tinción adecuada de los leucocitos al no interferir con las tinciones que se utilizan tradicionalmente (Wright-Giemsa, May-Grünwald) (Copete-Sierra, 2013). Sin embargo, en peces el EDTA ha mostrado ser un anticoagulante poco eficiente, especialmente debido a que hay un deterioro muy temprano de las células sanguíneas, lo que es una complicación al momento de realizar muestreos de una gran cantidad de animales. Por ejemplo, en un estudio hematológico en la especie de tiburón *Carcharhinidae plumbeus* la muestra de sangre se depositó en tubos con el anticoagulante

EDTA, describiéndose deterioros importantes de las células en un tiempo transcurrido de 5 horas, lo que afectó la precisión analítica del método (Arnold *et al.*, 2014). Debido a lo anterior en peces, aves y reptiles, la heparina litio ha sido el anticoagulante de elección debido a que evita la hemólisis de eritrocitos, manteniendo la muestra estable por más tiempo (Gálvez *et al.*, 2009; Vap *et al.*, 2012).

En peces el análisis hematológico es realizado bajo los mismos estándares sobre los cuales se realiza en mamíferos, salvo algunas excepciones como la utilización de contadores automatizados para realizar los recuentos de células sanguíneas, debido a la característica de presentar núcleo en todas las células sanguíneas (Arnés y Böhmwald, 2012). El recuento automático de leucocitos en pequeños mamíferos tiene un coeficiente de variación (CV) de 3,0 a 4,0% (Dacie y Lewis, 1991), lo que indica que la dispersión de datos en relación con el valor medio es baja. Esto hace que los contadores automatizados sean utilizados rutinariamente tanto en clínica de animales menores como en medicina de animales de la producción. Sin embargo, en peces la realidad es otra, ya que no se puede utilizar estos tipos de equipos para realizar los recuentos celulares.

El hemograma que se realiza en peces, contempla los análisis del eritrograma: hematocrito, hemoglobina, recuento total de eritrocitos, índices hematimétricos de Wintrobe (VCM, CHCM) y del leucograma: recuento total de leucocitos y fórmula diferencial, además de la observación de las características morfológicas celulares al frotis (Arnés y Böhmwald, 2012). Para realizar los recuentos celulares (Cray y Zaias, 2004) la muestra de sangre se diluye con un diluyente específico que para peces, aves y reptiles corresponde al diluyente Natt-Herrick (Natt y Herrick, 1952). Dentro de las propiedades de este diluyente está su capacidad de teñir las células, con lo que es posible diferenciar eritrocitos de leucocitos y trombocitos, pero no diferenciar los subtipos celulares de la línea blanca ni tampoco los trombocitos como tal. Posteriormente, el frotis sanguíneo se utilizará para diferenciar morfológicamente ambas subpoblaciones mediante el uso de tinciones como Wright/Giemsa o May-Grünwald-Giemsa (Arnés y Böhmwald, 2012).

Los métodos manuales y en particular los recuentos celulares comparten la característica de ser técnicas con una gran cantidad de fuentes de error, lo que conlleva a elevados coeficientes de variación. Dentro de éstas, las más comunes son diluciones incorrectas, mezcla

insuficiente de la sangre con el diluyente y llenado incorrecto de la cámara (Hrubec y Smith, 2010; Arnés y Böhmwald, 2012) o el incorrecto preparado del diluyente utilizado, equipos que no se encuentran calibrados como pipetas o cámaras (Vap *et al.*, 2012); por ello se deben tomar todas las precauciones necesarias para minimizar estos errores. En particular, la facilidad con la cual es posible confundir leucocitos de trombocitos o eritrocitos lisados cuando no existe el entrenamiento adecuado, hacen que este método se encuentre actualmente cuestionado de ser el estándar más apropiado para estas especies (Tavares-Dias *et al.*, 2002; Arnold *et al.*, 2014).

La hematología convencional considera métodos alternativos para el recuento de células en sangre. Así, a través del frotis sanguíneo, o también llamado método indirecto, es posible obtener estimaciones del número total de leucocitos sobre la extensión de sangre teñida (Martínez *et al.*, 2011).

Los frotis sanguíneos deben prepararse bajo criterios de control que aseguren los requerimientos necesarios para ser de utilidad en el examen microscópico. La experiencia de la persona que realiza el procesamiento de las muestras influye directamente en la calidad de los frotis sanguíneos (Vap *et al.*, 2012). Existe un protocolo comúnmente utilizado para realizar el frotis sanguíneo siguiendo las indicaciones de Hrubec y Smith (2010) a modo de disminuir los posibles errores que se pueden cometer durante su ejecución, como un incorrecto extendido, lisis celulares debido al incorrecto uso de anticoagulantes (Stoskopf, 1992) y agregados de trombocitos que dificultan la lectura del frotis (Hrubec y Smith, 2010).

Por lo tanto, la experiencia, eficiencia y conocimiento del hematólogo junto a una buena preparación de la muestra y correcto desarrollo de la técnica, es uno de los puntos fundamentales para obtener resultados con el menor error posible independiente de la técnica empleada para el recuento de leucocitos totales en peces. Asegurar un control en la calidad a lo largo del proceso preanalítico y analítico son esenciales para obtener el menor coeficiente de variación y así generar resultados confiables y precisos (Vap *et al.*, 2012).

En un estudio hematológico en aves, Latimer y Bienzele (2010) realizaron recuentos de leucocitos totales mediante el método del hemocitómetro con el cual obtuvieron un coeficiente de variación del 13% y mediante el método del frotis sanguíneo con un

coeficiente de variación del 28%. Otro estudio realizado por Buenaño (2010), en trucha arcoíris el recuento de leucocitos totales mediante el método del hemocitómetro resultó con un coeficiente de variación de 18%. En un trabajo de revisión de literatura realizado por Tavares-Dias *et al.* (2002) se muestran coeficientes de variación de diferentes especies de peces para el recuento total de leucocitos, con rangos que varían entre 8% a 49,8%. En otro estudio realizado en peces de la especie *Scomberomorus maculatus* y *Opisthonema oglinum*, el coeficiente de variación para el recuento de leucocitos totales fue de 80,1% y 89,7% respectivamente (Pitombeira *et al.*, 1968). En el estudio realizado por Tavares-Dias *et al.* (2002) en *Piaractus mesopotamicus* se compararon los valores de cuenta de leucocitos totales mediante el método del hemocitómetro y mediante un método indirecto de cuenta en frotis sanguíneo. Los resultados evidenciaron recuentos totales de leucocitos sin diferencias estadísticas y que el coeficiente de variación obtenido en el método del frotis sanguíneo fue menor al obtenido por el método del hemocitómetro. Estos autores señalan que el mayor valor de coeficiente de variación del método del hemocitómetro se puede asociar a una tinción ineficiente de leucocitos en la cámara de Neubauer por el diluyente Natt y Herrick (1952) utilizado en el método del hemocitómetro, además de que éste diluyente, pese a tener cualidades tincionales, no permite en algunas especies una clara diferenciación entre leucocitos y trombocitos durante el recuento en la cámara de Neubauer (Tavares-Dias *et al.*, 2002). En un estudio realizado por Kekic e Ivanc (1982) también reportaron una deficiencia en la tinción del diluyente en el conteo de leucocitos en peces. Sin embargo, otros autores lo recomiendan para cuantificar los leucocitos totales en peces (Stoskopf, 1993; Hrubec y Smith, 2010). Natt y Herrick (1952) cuestionan la precisión de los métodos indirectos basados en las extensiones de frotis sanguíneos para el recuento de leucocitos totales, cuya razón se fundamenta en que se asume una distribución uniforme de células sanguíneas en la extensión de sangre, cuando en rigor ésta no existe ya que por ejemplo, los polimorfonucleares se ubican hacia los bordes del extendido. Vap *et al.* (2002) consideran que la posibilidad de realizar los recuentos de leucocitos totales en frotis sanguíneos en peces, pueden ser de utilidad en estudios de campo, donde el acceso al laboratorio es limitado.

Debido a que no es posible realizar recuentos de células sanguíneas en contadores automatizados en peces la recomendación de Tavares-Dias *et al.* (2002) es realizar más

estudios para resolver el problema del recuento de leucocitos totales en peces, potenciando herramientas que se puedan ocupar para obtener resultados confiables.

Un estudio realizado por Véliz (2013) en salmón del Atlántico (*Salmo salar*), especie de la misma familia que la trucha arcoíris, propone utilizar un método indirecto de recuento de leucocitos totales como método alternativo al comúnmente utilizado en peces. El método propuesto, se basa en un modelo de estudio desarrollado por Walberg (2001), el cual validó una fórmula para la estimación de leucocitos totales en frotis sanguíneo de aves, que se obtiene a partir del promedio de células contadas por campos consecutivos en aumento mayor (40x), usando no menos de 10 campos, y multiplicado por un factor (2000). Los resultados mostraron un coeficiente de variación por el método directo con hemocitometría de 28,4% y 36,4% por el método indirecto. Esta fórmula también se ha utilizado en un estudio realizado por Hidalgo *et al.* (2014) en pollos Broiler para determinar el número total de leucocitos en sangre, sin detallar el CV obtenido, aún cuando sus resultados muestran que los recuentos se encuentran dentro de los intervalos de referencia para la especie y edad de faenamiento.

Por lo anteriormente expuesto en relación con la importancia de la producción de salmones y sanidad de los individuos que la conforman, sumado a la diversidad de información hematológica es que la presente memoria de título tiene como objetivo principal aportar al desarrollo de un método indirecto de recuento de leucocitos totales para ser utilizada en terreno como una herramienta alternativa al método de laboratorio por hemocitometría.

## **OBJETIVO GENERAL**

Establecer un método de recuento indirecto de leucocitos totales en frotis sanguíneo en individuos de trucha arcoíris clínicamente sanos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.** Determinar el número total de leucocitos mediante el método directo del hemocitómetro, en individuos de trucha arcoíris clínicamente sanos.
- 2.** Determinar el número total de leucocitos mediante un método indirecto en frotis sanguíneo, en individuos de trucha arcoíris clínicamente sanos.
- 3.** Establecer la correlación entre ambos métodos de recuentos de leucocitos totales.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### Individuos:

En el estudio se utilizaron 54 individuos sanos de trucha arcoíris, escogidos al azar, procedentes de la piscicultura Río Blanco, ubicada a 35 kilómetros de la ciudad de Los Andes, Quinta región. Estos peces fueron trasladados a la Unidad de Patología de Organismos Acuáticos del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile donde permanecieron en aclimatación durante 2 semanas previo al muestreo (Anexo N°1). Se mantuvieron en un estanque (estanque A) de 5.000 litros con un sistema de circulación de agua abierto y alimentados con una ración diaria en relación al 1% de su peso vivo. El peso promedio al muestreo fue de 60 gramos. La temperatura del agua se mantuvo constante a un valor promedio de 9,6 °C, con una concentración promedio de oxígeno disuelto de 8,7 mg/dL y una saturación de oxígeno de 85% en promedio, constantes medidas con el Oxímetro, modelo Hanna Oxy-check©.

Durante las dos semanas en que los peces fueron mantenidos en los estanques, se observó su aclimatación y si presentaban conductas o lesiones sugerentes de algún tipo de estrés o enfermedad. De acuerdo a lo señalado por Sierra *et al.* (2011) condiciones que pueden indicar algún tipo de patología o anormalidad son: lesiones evidentes en las escamas como ulceraciones o protuberancias, anormalidades en los globos oculares como la exoftalmia, cambios anormales en la frecuencia de apertura opercular, conductas de nado errático o de letargia, cambios en la coloración u otras anormalidades evidentes en opérculos, aletas o cola. No se registraron ni lesiones ni mortalidades durante este período.

### Toma de Muestra:

Una vez finalizado el período de aclimatación se obtuvieron muestras de sangre. Todos los peces se muestrearon de forma individual en dos ocasiones, separadas por un período de descanso de 2 semanas, durante el cual fueron alimentados y mantenidos bajo las condiciones señaladas anteriormente. En cada tiempo de muestreo se analizaron 15 individuos por día para asegurar la calidad en el procesamiento de las muestras, excepto el día 1 de muestreo que sólo se trabajó con 9 individuos (Tabla N°1).

**Tabla N°1: Esquema de muestreo de trucha arcoíris.**

		ETAPA MUESTREO 1		ETAPA MUESTREO 2			
		DÍA MUESTREO	N° INDIVIDUOS MUESTREADOS	DÍA MUESTREO	N° INDIVIDUOS MUESTREADOS		
ESTANQUE A		1	9	ESTANQUE B	RECESO 2 SEMANAS	1	9
		2	15			2	15
		3	15			3	15
		4	15			4	15

Previo a la obtención de sangre, los peces se mantuvieron con ayuno de 12 horas. En cada evento de muestreo los peces que se mantenían en la Unidad de Patología de Organismos Acuáticos, fueron llevados al laboratorio de Hematología y Bioquímica Clínica para iniciar la toma de muestra. Ambas unidades pertenecen al Departamento de Patología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile

El procedimiento que se siguió consistió en tener 3 cubetas: una con agua del estanque (cubeta 1), otra con solución anestésica (cubeta 2) y otra con agua del estanque y difusor de aire o de recuperación (cubeta 3). Quince peces por muestreo fueron depositados en la cubeta 1 y trasladados desde la Unidad de Patología de Organismos Acuáticos al laboratorio de Hematología y Bioquímica Clínica. Cada pez fue depositado en la cubeta 2 que contenía una dosis de inducción rápida de 120 mg/L de metasulfonato de tricaína (Dolical 80%®, Centrovét). Cuando evidenciaron estar bajo la influencia de la anestesia, caracterizada por la disminución de su frecuencia opercular y nado errático, se procedió a la extracción de sangre. Este procedimiento se realizó mediante punción de la vena caudal, la vía más común para la obtención de sangre en salmones (Rudolph y Villouta, 2003). Se utilizó una jeringa de 3 mL y aguja de 21 G, estéril, en ángulo de 45° con respecto a la superficie ventral, en la zona ubicada por detrás de la aleta anal (Black, 2000).

Se extrajo 1 mL de sangre y depositó en tubos con heparina litio (BD Vacutainer®, NJ USA. 68 USP), se homogenizó suavemente durante 30 segundos para mezclar con el anticoagulante, y se mantuvo en refrigeración a 4°C hasta su procesamiento. La elección del anticoagulante fue debido a la capacidad para evitar la hemólisis de eritrocitos y la

mantención de la integridad de las células durante 6 a 10 horas (Gálvez *et al.*, 2009). Una vez finalizada la extracción de sangre, cada pez fue depositado en la cubeta 3 o de recuperación y trasladados nuevamente a la Unidad de Patología de Organismos Acuáticos donde fueron depositados en otro estanque (estanque B) para separar los muestreados de no muestreados, pero con las mismas características y condiciones de agua, temperatura y oxigenación descritos anteriormente.

Procesamiento de las Muestras: Se realizó en el Laboratorio de Hematología y Bioquímica Clínica, Departamento de Patología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

1.- Frotis sanguíneo: ejecución y tinción (Hrubec y Smith, 2010)

De cada muestra previamente identificada individualmente se obtuvieron 3 frotis sanguíneos desde el tubo con anticoagulante, utilizando el método del portaobjeto (Anexo 2). Cada frotis se dejó secar al aire y luego se fijó con alcohol metílico absoluto (metanol 95%) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se procedió a teñir con solución Giemsa por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó con agua corriente durante 3 minutos y se dejaron secar al aire.

2.- Recuento total directo de células leucocitarias por el método del Hemocitómetro (método directo):

Se procedió de acuerdo con el protocolo estándar descrito Hrubec y Smith (2010). Se obtuvo de cada tubo con anticoagulante 10  $\mu$ L de sangre y se depositó en un tubo eppendorf con 990  $\mu$ L de diluyente Natt-Herrick (Natt y Herrick, 1952) para obtener una dilución 1:100. Se homogenizó por 30 segundos mediante movimientos lentos con la mano, sin agitar para evitar la hemólisis de las células. La dilución se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente y se procedió a llenar la cámara de Neubauer en duplicado con micropipeta. Se utilizó una cámara de contraste Neubauer Improved (Marienfeld®, Germany) de 0,1 mm de profundidad y una superficie de 0,0025 mm<sup>2</sup>. Luego se colocó la cámara en un microscopio óptico (Carl Zeiss® Standard 20), y se dejó reposar durante 1 minuto para estabilizar el líquido. Con objetivo

menor (10x) se ubicó el campo de observación en la cámara, y posteriormente se procedió a realizar el recuento con objetivo mayor (40x) (Anexo 2). Se contaron los cuatro cuadrantes primarios (Anexo 3) y se obtuvo un número total de células. Se procedió bajo los mismos parámetros con el duplicado. Ambos valores resultantes corresponden a recuentos celulares totales obtenidos desde una muestra y dilución única. El valor final fue el promedio de ambos y se registró en una planilla excel.

### 3.- Selección de frotis sanguíneo:

Cada frotis procesado en el punto 1 fue observado macroscópicamente y microscópicamente para seleccionar sólo 2 de ellos. Macroscópicamente, lo fundamental fue obtener un frotis de grosor y extensión de acuerdo a los criterios establecidos por Hrubec y Smith (2010) y Vap *et al.* (2012). Luego se procedió a visualizar en el aumento menor (10x) de un microscopio óptico (Carl Zeiss®, modelo Standard 20) la calidad de tinción, la distribución de las células y establecer las zonas donde las células se dispusieron formando una monocapa (Anexo 3).

### 4.- Estudio celular diferencial en el frotis sanguíneo:

Debido a que en peces el recuento total de células obtenido en cámara de Neubauer corresponde conjuntamente a leucocitos y trombocitos, es necesario realizar un recuento diferencial en frotis sanguíneo para obtener separadamente el número total de leucocitos y trombocitos. Los frotis seleccionados en el punto 3 fueron utilizados en esta etapa. Con un microscopio óptico (Carl Zeiss®, modelo Standard 20) en objetivo de inmersión (100x) se contó un total de 100 leucocitos y separadamente se obtuvo el recuento de trombocitos. A partir de los valores porcentuales, se obtuvo el valor absoluto (células/ $\mu$ L) respecto del obtenido en la cámara de Neubauer de acuerdo a metodología descrita previamente por Hrubec y Smith (2010).

### 5.- Recuento indirecto de leucocitos en el frotis sanguíneo:

Los dos frotis sanguíneos seleccionados para el estudio diferencial celular también fueron utilizados para realizar el recuento indirecto con la metodología de Walberg (2001). De cada frotis y área de monocapa seleccionada, se realizó el recuento en 10 campos de observación al azar con aumento mayor (40x) en microscopio óptico (Carl Zeiss®, modelo Standard 20).

En cada campo se estableció un orden para no superponer áreas y así no duplicar células ya contadas (Anexo 3). Cada recuento se multiplicó por una constante de 2.000 y se obtuvo el valor absoluto de leucocitos totales (células/ $\mu$ L). Ambos valores resultantes corresponden a recuentos celulares totales obtenidos desde una misma muestra. El valor final fue el promedio de ambos.

#### 6.- Análisis estadístico:

Se realizó un análisis descriptivo obteniéndose medidas de resumen mediante el programa estadístico InfoStat® (Di Rienzo *et al.*, 2015).

Se comprobó la normalidad de las variables, mediante la prueba de Shapiro-Wilks y se utilizó la prueba no paramétrica de Spearman (Balzarini *et al.*, 2008) para correlacionar las variables cuantitativas obtenidas en el recuento indirecto en el frotis sanguíneo y las variables del recuento directo con la cámara de Neubauer. Se determinó el grado de asociación entre las medias de cada recuento y los coeficientes de variación obtenidos en cada variable. Para realizar todas las pruebas se utilizó el programa estadístico InfoStat® (Di Rienzo *et al.*, 2015).

## **RESULTADOS**

El estudio contempló a 54 individuos sanos de la especie *Oncorhynchus mykiss* provenientes de la piscicultura de Río Blanco, comuna de Los Andes, V región. A cada individuo se le efectuó la toma de muestra sanguínea en dos ocasiones, con un intervalo de dos semanas entre las extracciones. Cuatro mediciones fueron descartadas debido a que no fue posible extraer 1 mL de sangre, cantidad necesaria para ser depositada en los tubos con el anticoagulante.

Debido a lo anterior, se efectuaron 104 recuentos de leucocitos totales mediante el método del hemocitómetro y mediante el método del frotis sanguíneo, respectivamente.

### **I. Número total de leucocitos obtenidos mediante el método del hemocitómetro en individuos de trucha arcoíris clínicamente sanos.**

A cada individuo se le realizó en duplicado el recuento de células leucocitarias en cámara de Neubauer (RTL-CN). Cada recuento se efectuó en microscopio óptico Zeiss® y contempló realizar una primera observación en aumento 10x (figura 1) para ubicar las áreas de recuento y luego amplificar a 40x (figura 2) para realizar los recuentos de acuerdo a la metodología estándar descrita en Anexo N°3 (Hrubec y Smith, 2010).

En la tabla N°2 se muestran los resultados obtenidos como valor final promedio por individuo del recuento total leucocitario en cámara de Neubauer.

**Tabla N°2.- Recuentos totales de leucocitos en cámara de Neubauer expresado en N° de Leucocitos totales/ $\mu$ L.**

Muestra	RTL-CN	Muestra	RTL-CN	Muestra	RTL-CN	Muestra	RTL-CN
1	10798	27	23323	53	13822	79	27633
2	10912	28	12065	54	19662	80	17377
3	10938	29	18291	55	21870	81	21071
4	18840	30	18666	56	13129	82	23250
5	14122	31	24025	57	13770	83	7428
6	20993	32	35654	58	13726	84	28695
7	12125	33	27703	59	12575	85	58604
8	18140	34	34009	60	22936	86	17267
9	12191	35	21048	61	9539	87	8623
10	25829	36	13642	62	19827	88	11073
11	15752	37	28435	63	23652	89	21251
12	22385	38	27318	64	13851	90	11889
13	22472	39	11796	65	16482	91	11941
14	19702	40	20311	66	27079	92	11259
15	38172	41	17029	67	22870	93	11519
16	14366	42	17039	68	22468	94	17329
17	22883	43	8204	69	21568	95	17759
18	31488	44	11042	70	22955	96	12788
19	47175	45	7997	71	34353	97	19024
20	31951	46	8697	72	17233	98	10047
21	40371	47	19307	73	26761	99	12284
22	27672	48	11413	74	9529	100	19439
23	27733	49	23919	75	15362	101	11280
24	51641	50	11959	76	25005	102	20409
25	28663	51	7668	77	20616	103	5765
26	15722	52	9062	78	15237	104	14352

RTL-CN: Recuento total leucocitario mediante método cámara de Neubauer.

Para el RTL-CN el tamaño de la muestra fue de 104 individuos, el promedio fue 19.499 leucocitos/ $\mu$ L, con un valor mínimo de 5.765 y un valor máximo de 58.604, una desviación estándar de 9.336 y un coeficiente de variación de 47,88 (Anexo 4). En el anexo 5 se puede observar el gráfico de dispersión de los valores obtenidos.

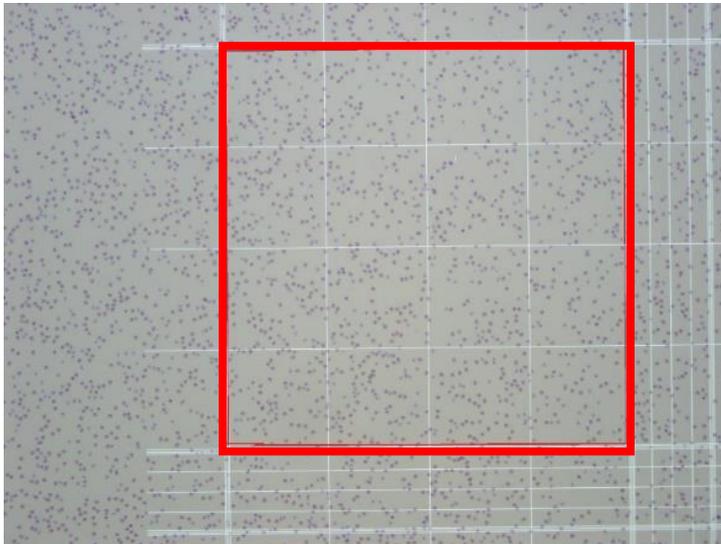


Figura 1: Imagen de área de recuento de leucocitos en cámara de Neubauer. Se muestra un cuadrante primario en color rojo. Observación en microscopio óptico Zeiss © 10x. Diluyente Natt-Herrick.

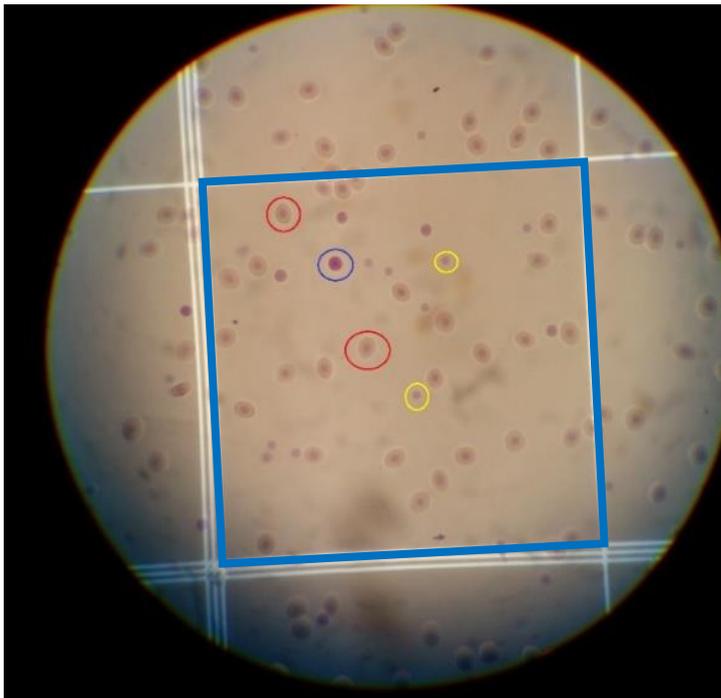


Figura 2: Imagen de área de recuento de leucocitos en cámara de Neubauer. Se muestra un cuadrante secundario en color azul. El círculo azul muestra la célula a contar. Además se observan eritrocitos maduros (círculo rojo) y eritrocitos hemolisados (círculo amarillo). Microscopio óptico Zeiss © 40x. Diluyente Natt-Herrick.

## **II. Número total de leucocitos obtenidos mediante el método del frotis sanguíneo en individuos de trucha arcoíris clínicamente sanos.**

A cada individuo se le realizó el recuento de células leucocitarias mediante el método del frotis sanguíneo (RTL-FS) en cuadruplicado, obteniendo un valor promedio para el recuento de leucocitos totales. En la tabla N°3 se muestran los resultados obtenidos del recuento total leucocitario en frotis sanguíneo o método indirecto.

**Tabla N°3.- Recuentos totales de leucocitos en frotis sanguíneo expresado en N° de Leucocitos totales/ $\mu$ L.**

Muestra	RTL-FS	Muestra	RTL-FS	Muestra	RTL-FS	Muestra	RTL-FS
1	30100	27	57850	53	27050	79	55800
2	18350	28	29750	54	30700	80	57500
3	11750	29	63950	55	38300	81	66100
4	32600	30	52700	56	42550	82	55500
5	31600	31	55550	57	38300	83	26500
6	42500	32	58250	58	41200	84	40250
7	28650	33	51900	59	34550	85	87150
8	34800	34	46950	60	56000	86	49250
9	25950	35	36400	61	39650	87	20600
10	43550	36	43150	62	59750	88	34250
11	22950	37	42500	63	70100	89	55000
12	33550	38	57850	64	41550	90	37850
13	28950	39	30850	65	46300	91	34500
14	51000	40	47100	66	47750	92	35550
15	45850	41	45150	67	62700	93	43450
16	32100	42	45550	68	47700	94	49050
17	23550	43	30000	69	43450	95	54800
18	37950	44	24400	70	59850	96	33700
19	38250	45	21500	71	76700	97	42450
20	55500	46	20800	72	63950	98	30800
21	59250	47	41800	73	77600	99	44200
22	50800	48	35100	74	36400	100	54200
23	54050	49	31600	75	43400	101	39450
24	80300	50	37350	76	53200	102	43750
25	49700	51	33900	77	48550	103	29850
26	61100	52	37100	78	38350	104	38650

RTL-FS: Recuento total leucocitario mediante método frotis sanguíneo.

Para el RTL-FS el tamaño de la muestra fue de 104 individuos, el promedio fue de 43.552 leucocitos/ $\mu$ L, con un valor mínimo de 11.750 y un valor máximo de 87.150, una desviación estándar de 14.016 y un coeficiente de variación de 32,18. (Anexo 4). En el anexo 5 se puede observar el gráfico de dispersión de los valores obtenidos.

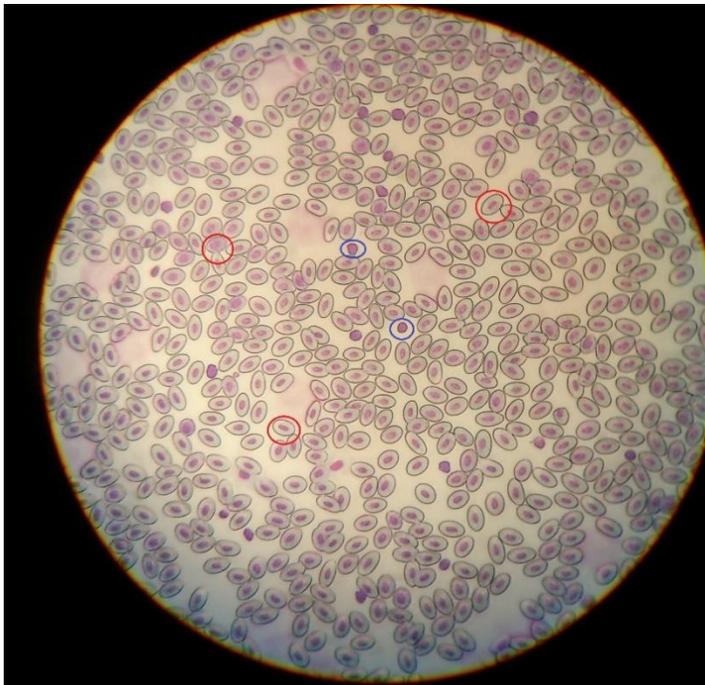


Figura 3: Imagen de frotis sanguíneo para recuento indirecto de leucocitos. Se observa una monocapa de células con espacios adecuados que permiten identificar cada tipo celular presente. Se observan eritrocitos en distintos estados de maduración (círculo rojo) y leucocitos (círculo azul). Tinción Giemsa 10x.

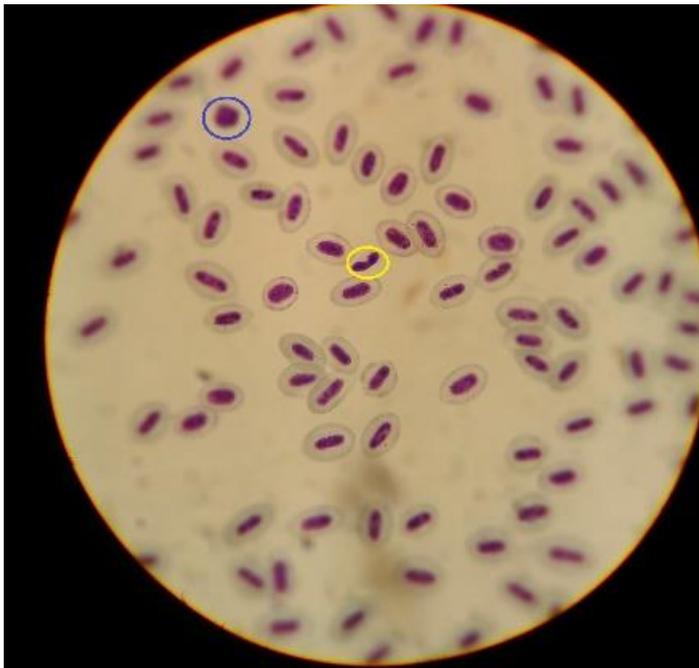


Figura 4: Imagen de frotis sanguíneo para recuento indirecto de leucocitos. Se observa un trombocito (círculo amarillo) y un leucocito (círculo azul) Tinción Giemsa 40x.

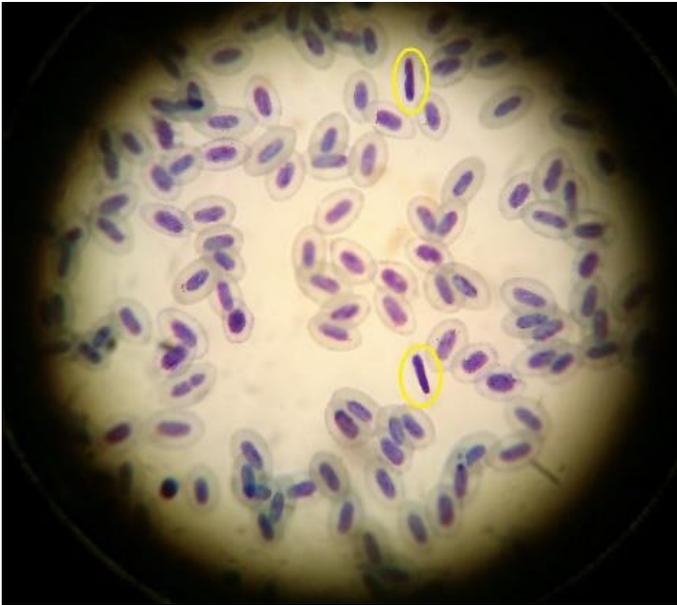


Figura 5: Imagen de frotis sanguíneo para recuento indirecto de leucocitos. Se observan dos trombocitos (círculo amarillo) Tinción Giemsa 40x.

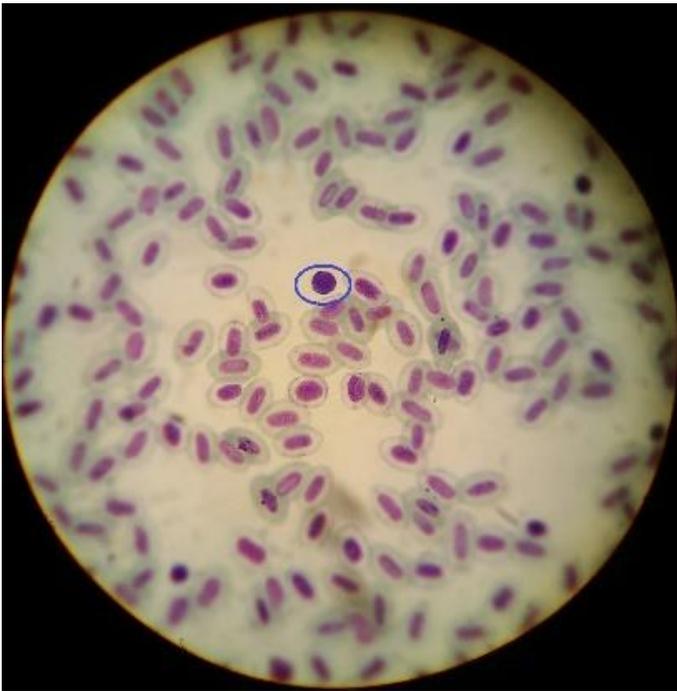


Figura 6: Imagen de frotis sanguíneo para recuento indirecto de leucocitos. Se observa un leucocito (círculo azul) Tinción Giemsa 40x.

### **III. Correlación entre ambos métodos de recuento de leucocitos totales.**

Para correlacionar los resultados de recuento de leucocitos totales obtenidos mediante el método directo e indirecto, se utilizó el programa estadístico InfoStat® (Di Rienzo *et al.*, 2015). La prueba de Shapiro-Wilks (tabla N°4) se utilizó para establecer la normalidad de distribución de los datos utilizados en RTL-CN y RTL-FS.

**Tabla N°4.- Prueba de Shapiro-Wilks para las variables RTL-CN y RTL-FS.**

<b>Variable</b>	<b>n</b>	<b><math>\alpha</math></b>	<b>p</b>
<b>RTL-CN</b>	104	0,05	<0,0001
<b>RTL-FS</b>	104	0,05	0,3110

RTL-CN: Recuento total leucocitario mediante método directo en cámara de Neubauer.

RTL-FS: Recuento total leucocitario mediante método indirecto en frotis sanguíneo.

n: Tamaño de la muestra.

$\alpha$ : Nivel de confianza.

p: valor de  $p < 0,05$

Los resultados que muestra la tabla anterior indican que para RTL-CN la distribución no es normal ( $p < 0,0001$ ) y para RTL-FS la distribución sí es normal ( $p = 0,3110$ ). De esta manera se puede saber qué tipo de prueba usar para correlacionar ambos métodos. Debido a que los datos son recuentos y su distribución no es normal, se debe utilizar una prueba no paramétrica.

Se utilizó el coeficiente de correlación no paramétrico de Spearman, ya que éste puede medir la asociación entre dos variables cuantitativas que no distribuyen normal (Balzarini *et al.*, 2008). La tabla N°5 muestra el resultado de esta correlación.

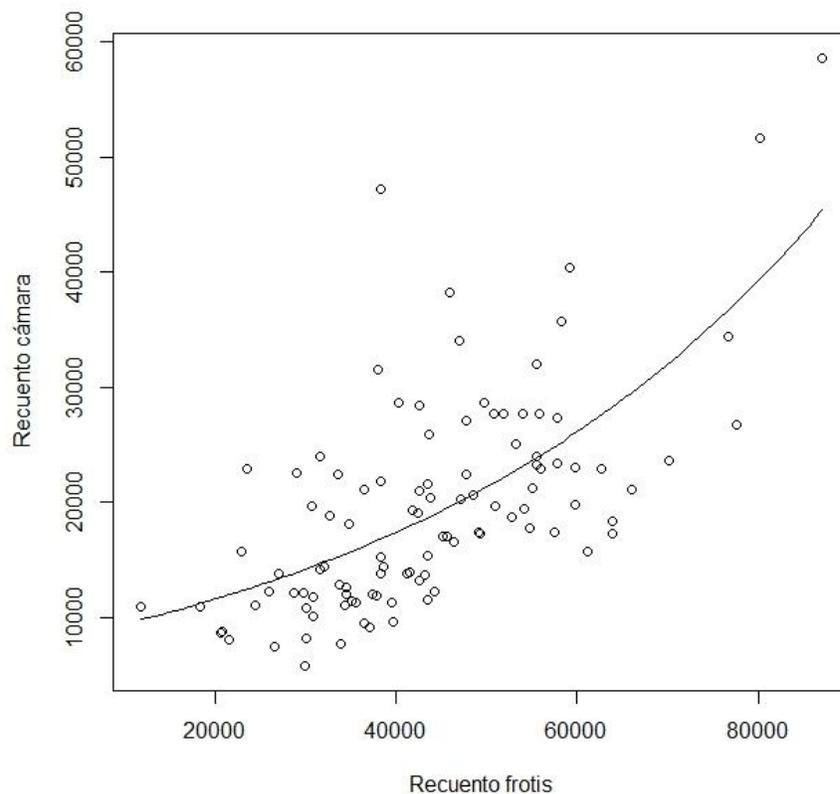
**Tabla N°5.- Resultados de la correlación de Spearman entre RTL-CN y RTL-FS.**

**Correlación de Spearman**

<b>Variable (1)</b>	<b>Variable(2)</b>	<b>n</b>	<b>Spearman</b>	<b>p-valor</b>
RTL-CN	RTL-FS	104	0,65	<0,0001

RTL-CN: Recuento total leucocitario mediante método directo en cámara de Neubauer.  
 RTL-FS: Recuento total leucocitario mediante método indirecto en frotis sanguíneo.  
 n: Tamaño de muestra.  
 Spearman: Coeficiente de correlación.  
 p: valor de  $p < 0,05$

Se puede observar que la correlación mediante la prueba de Spearman corresponde a 0,65 ( $p < 0,0001$ ), lo que indica una correlación positiva entre ambas variables y estadísticamente significativa (Balzarini *et al.*, 2008), en el siguiente gráfico (gráfico N° 1) se puede observar la pendiente obtenida entre ambas variables de recuento de leucocitos totales.



**Gráfico N° 1.- Pendiente para variables recuento de leucocitos totales en cámara de Neubauer (recuento cámara) y recuento de leucocitos totales en frotis sanguíneo (recuento frotis) obtenida mediante el programa estadístico InfoStat® (Di Rienzo *et al.*, 2015).**

## DISCUSIÓN

La hematología ha mostrado ser una buena herramienta de apoyo al diagnóstico en la medicina veterinaria de mamíferos domésticos de compañía y de producción (Gálvez *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2011). En especies acuícolas los parámetros sanguíneos se deben estandarizar, pero es difícil debido a la gran variabilidad de peces de importancia comercial y de las condiciones en las cuales se encuentran las diferentes especies de acuerdo a su ubicación geográfica (Correa *et al.*, 2009).

Distintos factores pueden ser utilizados como herramienta para evaluar el estado sanitario de los peces de producción (Copete-Sierra, 2013). Dentro de ellos factores ambientales (ubicación geográfica, clima, manejo, alimentación) y genéticos (especie, raza) han sido ampliamente estudiados en cómo influyen en estas especies y sus características celulares y metabólicas sanguíneas (Tavares-Dias *et al.*, 2002; De Pedro *et al.*, 2004; Centeno *et al.*, 2007; Correa *et al.*, 2009; Wittwer, 2012). Variaciones en las condiciones ambientales como temperatura, pH y oxígeno causan modificaciones fisiológicas en los niveles de parámetros sanguíneos (Centeno *et al.*, 2007). Las variaciones intraespecíficas de leucocitos son influenciadas por características propias de cada individuo relacionadas con el carácter migratorio de los leucocitos entre la circulación y los órganos leucopoyéticos (bazo y riñón) en respuesta a los estímulos ambientales a que cada individuo está expuesto (Correa *et al.*, 2009). También factores fisiológicos como ciclo reproductivo, edad, género y nutrición han sido descritos como generadores de cambios en los parámetros sanguíneos de los peces (De Pedro *et al.*, 2004). Correa *et al.* (2009) encontraron diferencias en el recuento total de trombocitos entre hembras y machos de la especie *S. cuspidus*. Las hembras registraron el doble de trombocitos que los machos, y en el número de linfocitos, neutrófilos y eosinófilos también encontraron diferencias significativas. Además, ambos géneros se encontraban en el mismo ambiente, sometidos a las mismas situaciones, pero los machos revelaron la condición típica de un animal estresado, manifestando al análisis sanguíneo linfopenia, neutrofilia y eosinofilia, lo que fue atribuido a una mayor sensibilidad al manejo en cautiverio en los machos a diferencia de las hembras.

Cambios en los recuentos celulares son de hecho indicadores de situaciones anómalas en los individuos, como lo mencionan Conroy (1972), Satchell (1991) y Stoskopf (1993) quienes

señalan que los aumentos o disminuciones en el número de células hemáticas pueden deberse a procesos patológicos, la linfopenia puede ser causada por el estrés de la hipoxia, septicemias bacteriales e infecciones por hongos. La neutrofilia es habitual en diversas patologías, como inflamaciones, estrés, infecciones bacterianas y protozoarias. Adicionalmente, la linfopenia puede ser el resultado de inmunosupresión causada por estrés durante la época reproductiva (Stoskopf, 1993; Olabuenaga, 2000; Ruiz *et al.*, 2003; Wittwer, 2012).

Para la medicina poblacional, los desafíos particularmente en la acuicultura, pasan por utilizar herramientas que ayuden a extraer información relevante para la evaluación y mantención del estado sanitario. Un instrumento utilizado comúnmente en medicina de animales de la producción es la hematología, ya que provee información de apoyo al diagnóstico (Buenaño, 2010). Dentro de la variabilidad propia de las especies acuícolas, el estandarizar criterios con los cuales los médicos veterinarios tengan herramientas objetivas en terreno para la toma de decisiones, facilitaría el control sanitario en especies acuícolas de importancia comercial, asegurando que los sistemas de cultivos sean sostenibles en el tiempo. Es debido a esto, que este estudio se enfoca en aportar al desarrollo de una herramienta que pueda ser utilizada en el monitoreo en terreno de los cultivos de salmónidos, a través de un método de recuento de leucocitos totales realizado en frotis sanguíneo.

El estudio contempló a 54 individuos sanos de la especie *Oncorhynchus mykiss* provenientes de la piscicultura de Río Blanco, comuna de Los Andes, V región. Estos individuos se mantuvieron en un ambiente controlado y bajo las mismas condiciones para disminuir las variaciones que se pudieran atribuir al ambiente. A cada individuo se le efectuó la extracción de sangre en dos ocasiones, con un intervalo de dos semanas entre extracciones. Cada muestra se utilizó para realizar recuentos totales de leucocitos por el método del hemocitómetro (estándar) y por el método en frotis sanguíneo.

Previo al muestreo se estipuló un período de entrenamiento, que contempló desarrollar habilidades en la toma de muestra para disminuir la hemólisis que se puede producir al momento de extraer la sangre, desarrollar habilidades en la correcta extensión de frotis sanguíneos y posterior tinción, entrenamiento en el recuento de ambas técnicas, tanto en la hemocimetría como en el frotis sanguíneo, estudio de la morfología sanguínea en la especie

*Oncorhynchus mykiss*, y conocimiento de los errores que se pueden cometer en los métodos de recuentos manuales de células sanguíneas. Todas estas etapas previas al análisis de sangre propiamente tal ayudan a disminuir los errores que se pueden cometer en la fase preanalítica y analítica. Asegurar la calidad y control a lo largo de todas las fases de los análisis hematológicos son esenciales para proporcionar resultados confiables, en especial en especies no mamíferas donde se describen grados mayores de error debido a que los recuentos de células sanguíneas se deben realizar de forma manual y no automatizadas como en especies mamíferas (Stoskopf, 1992; Cray y Zaias, 2004; Hrubec y Smith, 2010; Vap *et al.*, 2012; Wittwer, 2012).

La etapa de muestreo se dividió en 8 días, durante los cuales en cada sesión de muestreo se consideró obtener la sangre de 15 individuos, a modo de obtener la sangre en la mañana para procesar las muestras con la sangre fresca durante las horas posteriores. Las muestras fueron mantenidas en refrigeración a una temperatura de 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio, en tubos con el anticoagulante heparina litio, ya que se describe que con este anticoagulante existe una buena capacidad para evitar la hemólisis de las células sanguíneas de los peces, manteniendo la integridad de éstas por 6 a 10 horas (Gálvez *et al.*, 2009). La única consideración que se debe tener con este anticoagulante es que produce agregación plaquetaria que se acentúa con el correr de las horas (Martínez *et al.*, 2011). Por ello, trabajar con la sangre lo más fresca posible y con un bajo número de muestras por día es una forma de disminuir el efecto de agregación plaquetaria y contar con una buena calidad de muestra. Así mismo, el trabajar con una baja cantidad de muestras por día, da la posibilidad de realizar una toma de muestra más controlada y de esta forma disminuir las fuentes de error que se pueden producir al momento de proceder.

En mamíferos, la forma común para obtener valores sanguíneos incluyendo el número total de leucocitos, es a través de equipos hematológicos automatizados. En los últimos años se han realizado intentos de desarrollo tecnológico en la generación de equipamientos que cumplan esta función en especies con todas sus células sanguíneas nucleadas, pero los reportes que existen no validan estas tecnologías para este tipo de especies (Gálvez *et al.*, 2009; Latimer y Bienzele, 2010; Martínez *et al.*, 2011; Arnés y Böhmwald, 2012). Así, en

estas especies, lo que actualmente está validado es el uso de recuentos manuales para la obtención de números totales de células sanguíneas.

Un punto crítico en el método manual de recuento celular es la experiencia por parte de quien realiza los recuentos y la confiabilidad en los recuentos manuales es una de las mayores dificultades para el diagnóstico hematológico en peces (Cray y Zaias, 2004; Hrubec y Smith, 2010; Wittwer, 2012). El método manual de recuento celular tiene múltiples fuentes de error como son la dilución y homogenización de la muestra, llenado de la cámara de Neubauer, identificación y recuento de células y por lo mismo, sus coeficientes de variación son amplios. Debido a esto, son limitados los reportes que describen resultados obtenidos en las técnicas de muestreo (Marino *et al.*, 2001).

En este estudio el recuento de leucocitos totales por hemocitometría se realizó siguiendo el protocolo descrito por Hrubec y Smith (2010), considerando una etapa previa de entrenamiento para evitar las fuentes de error anteriormente nombradas y considerando el trabajar con muestras de sangre fresca. El resultado mostró un coeficiente de variación para el recuento de leucocitos totales por hemocitometría de 47,88%. Este resultado se encuentra sobre el rango estipulado por Vap *et al.* (2012) quien señala que los recuentos de leucocitos totales mediante el método estándar en individuos no mamíferos son amplios e imprecisos con rangos de coeficiente de variación entre 20 a 40% (Lumsden, 2000; Harr *et al.*, 2005). Sin embargo, cabe señalar, que estos autores incorporan en esa estimación, diversas especies de individuos no mamíferos, sin especificar cuáles o qué protocolo de recuento directo se utilizó. Esto es relevante debido a las diferencias propias de las especies no mamíferas así como también de los protocolos utilizados para esta técnica. Una visión más concreta es la descrita por Tavares-Dias *et al.* (2002) basado en una revisión de la literatura en distintas especies de peces, donde el recuento total de leucocitos mediante el método del hemocitómetro muestra coeficientes de variación en rango de 8 a 49,8%. Este resultado es más consistente con lo obtenido ya que está descrito en peces, pero bajo diferentes protocolos de trabajo de la metodología directa en cámara de Neubauer, lo que plantea una duda razonable en términos de si finalmente los amplios rangos de células sanguíneas se dan sólo debido a que son peces o también a la metodología. Aun así, existe un estudio realizado por Pitombeira *et al.* (1968) en ejemplares de *Scomberomorus maculatus*, donde el coeficiente

de variación por el método del hemocitómetro para el recuento de leucocitos totales fue de 80,1% y para el mismo recuento por el mismo método para la especie *Opisthonema oglinum* el coeficiente de variación fue de 89,7%, por lo que un rango amplio de coeficientes de variación es esperable de encontrar al realizar estudios de hemocitometría en peces. En aves también se ha realizado recuentos celulares mediante hemocitometría y en el caso de los recuentos de leucocitos totales se han reportado coeficientes de variación de 12% (Russo *et al.*, 1986) y de 13% (Latimer y Bienzele, 2010). Buenaño (2010) realizó un estudio hematológico en trucha arcoíris en 284 individuos en diferentes estados de madurez. El recuento de leucocitos totales mediante el método del hemocitómetro presentó un coeficiente de variación de 18%, sin embargo los resultados presentados provienen de una formulación de recuento de leucocitos totales no validado hasta ahora en peces, por lo que el coeficiente de variación resultante no sería confiable. En un estudio realizado por Véliz (2013) en 120 individuos de *Salmo salar* obtuvo un coeficiente de variación en el recuento de leucocitos totales mediante el método del hemocitómetro de 28,4%. Sin embargo, también realizó una modificación en la metodología ya que utilizó un sistema de captura de imágenes desde los campos de observación y recuento de leucocitos en la cámara de Neubauer. Al igual que el caso anterior, se incorporó una modificación al método directo. Los dos últimos estudios que se mencionan se efectuaron en individuos de la misma familia (trucha arcoíris y salmón del atlántico), por lo que son más comparables con nuestro estudio debido a la especie estudiada, pero no cumplieron íntegramente el protocolo descrito por Hrubec y Smith (2010) en la realización de hemocitometría, lo que podría explicar la diferencia entre los coeficientes de variación descritos.

En el caso de la realización de extendidos o frotis sanguíneos de buena calidad, los autores que describen esta etapa como un punto crítico, coinciden en la experiencia, técnica y habilidad por parte de la persona que realiza los extendidos (Troncoso, 1997; Flatland *et al.*, 2010; Vap *et al.*, 2012), así como también, contar con muestras de sangre fresca al momento de su procesamiento (Roberts, 1989).

Para el correcto estudio de los frotis sanguíneos, lo recomendado es obtener extendidos que contengan una buena distribución celular, lo que se caracteriza por visualizar bajo microscopio óptico áreas de recuento caracterizadas por una monocapa de células sanguíneas

(Allison y Mainkoth, 2007), evitando que las células se superpongan entre sí y que se produzcan espacios considerables entre las mismas, con lo cual es posible distinguirlas mejor. En este estudio, por cada individuo se realizaron 3 frotis sanguíneos, escogiendo 2 por su calidad macro y microscópica. Se estudiaron en el área de lectura recomendada o zona denominada cola de la extensión, primero en aumento menor (10x) visualizando que el extendido tuviera una distribución celular uniforme, y luego con aumento mayor (40x) observando que no se superpusieran las células, evitando zonas de lectura donde se encontraran agregaciones plaquetarias o zonas que tuvieran problemas con la tinción.

Nuestros resultados muestran que el recuento de leucocitos totales por el método del frotis sanguíneo presentó un coeficiente de variación de 32,18%, menor al 47,88% obtenido mediante hemocitometría. Este resultado es similar a lo descrito por Véliz (2013) en *Salmo salar*, quien obtuvo un coeficiente de variación de 36,4% con la misma metodología y misma fórmula de estimación de leucocitos totales de Walberg (2001). Existen pocos reportes en la literatura en relación con estimaciones en frotis de sangre para recuentos leucocitarios en individuos no mamíferos. Russo *et al.* (1986) realizaron recuentos de leucocitos totales con el método del frotis sanguíneo en dos especies de loro obteniendo un coeficiente de variación de 28%. Tavares-Dias *et al.* (2002), realizaron recuentos de leucocitos totales utilizando dos técnicas combinadas de hemocitometría y frotis sanguíneo obteniendo coeficientes de variación de 7,1 y 7,5 % respectivamente, valores más bajos que los obtenidos por la técnica directa (11,9%). Estos resultados son excepcionalmente bajos para técnicas indirectas, pero no son comparables debido a la metodología utilizada en cada una. Sin embargo, resulta interesante que en todos ellos, incluyendo nuestros resultados de estimación indirecta de leucocitos, el coeficiente de variación fue inferior al observado por la técnica directa con hemocitometría.

Los recuentos celulares efectuados en este estudio fueron debidamente ejecutados de acuerdo a los protocolos estándar descritos por Hrubec y Smith (2010) en la realización de hemocitometría, y lo descrito por Walberg (2001) en la realización del método del frotis sanguíneo. Nuestros resultados muestran que el coeficiente de variación obtenido por el método del frotis sanguíneo fue menor al obtenido por el método de hemocitometría en cámara de Neubauer. Esto podría explicarse por la sistematización de la metodología

utilizada y la preparación y entrenamiento de quien realizó los recuentos. Es bien sabida la gran variabilidad de resultados que se observan en estudios sanguíneos en peces, particularmente aquellos que dicen relación con células, por lo que considerar los puntos críticos de toma de muestra, diluciones, extendidos de sangre, observación de monocapa, etc. marcarían una diferencia. Adicionalmente, es interesante mencionar que pese a que la técnica directa es el estándar aún aceptado, hay algunos autores que cuestionan el método debido al diluyente utilizado. Kekic e Ivanc (1982), Tavares-Dias *et al.* (2002) y Arnold *et al.* (2014) mencionan que de acuerdo a sus investigaciones, el diluyente Natt y Herrick (1952), resultaría poco eficiente para realizar apropiados recuentos leucocitarios en peces en cámara de Neubauer debido principalmente a baja especificidad al momento de diferenciar aquellas células que deben ser incorporadas dentro del recuento. Indican además, que las capacidades de tinción del diluyente Natt y Herrick (1952) no son iguales para todas las especies no mamíferas, por lo que siempre se deben realizar ajustes en las concentraciones de los componentes y tiempos de exposición con la sangre.

En la clínica de animales menores, para obtener valores sanguíneos, lo comúnmente utilizado son los recuentos ejecutados en equipos automatizados, pero también se utiliza el método de hemocimetría cuando los volúmenes de sangre son muy pequeños para ser procesados en contadores automatizados o cuando se quiere comprobar la validez de algún resultado (Martínez *et al.*, 2011). Así mismo, en el análisis del frotis sanguíneo se pueden aplicar fórmulas que matemáticamente se encuentran validadas y que son utilizadas como herramientas para obtener estimaciones de valores sanguíneos, entre ellos los recuentos de leucocitos totales (Tvedten, 1994). Así, a través del frotis sanguíneo, o también llamado método indirecto, es posible obtener estimaciones del número total de leucocitos sobre la extensión de sangre teñida (Martínez *et al.*, 2011). Hasta el momento, en peces no existe una herramienta indirecta que se encuentre validada para estimar el valor de leucocitos totales. Por la semejanza en las características propias de las células sanguíneas y en busca de una metodología para ser aplicada en los peces, es que hasta la fecha el único estudio publicado y validado es el realizado por Walberg (2001), por lo que en este estudio fue utilizado como modelo para ser aplicado en peces en la búsqueda de aportar con el desarrollo de una herramienta que pueda ser utilizada en esta especie. Esta intención está en directa relación con lo expuesto por Vap *et al.* (2002), quienes consideran que el realizar los recuentos de

leucocitos totales en frotis sanguíneos en peces, pueden ser de utilidad en estudios de campo, especialmente cuando el acceso al laboratorio es limitado.

La literatura muestra que el registro de indicadores hematológicos en peces es de un amplio rango y variabilidad fluctuando entre 4.000 a 70.000 leucocitos totales/ $\mu$ L (Roberts, 1989; Anderson y Barney, 1991; Troncoso, 1997; Hrubec y Smith, 2010; Wittwer, 2012). Diversos son los factores que han contribuido a estos resultados, pero el número de individuos utilizados ha sido en general insuficiente y muy localizado para obtener valores más representativos (Tavares-Dias *et al.*, 2002; De Pedro *et al.*, 2004; Centeno *et al.*, 2007; Correa *et al.*, 2009; Wittwer, 2012). En este estudio se utilizaron 54 truchas arcoíris, muestreadas en duplicado con un intervalo de dos semanas. Esto permitió obtener un número de muestra mayor al que comúnmente se utilizan en estudios hematológicos en peces, lo que generó una cantidad de información adecuada para proceder con los análisis estadísticos declarados en el material y métodos.

Como ya se ha mencionado, las variables que se midieron en este estudio corresponden a recuentos celulares, específicamente recuentos totales de leucocitos por microlitro de sangre. Las variables de recuento son un tipo de información que cuenta con una amplia presencia en diversos ámbitos de investigación aplicada y se definen como el número de sucesos o eventos que ocurren en una misma unidad de observación durante un intervalo temporal o espacial definido (Lindsey, 1995). El conocimiento acerca de la naturaleza de una variable, así como la identificación de sus características distribucionales, constituyen la base a partir de la cual se justifica la aplicación de un modelo estadístico determinado (Vives, 2002). En este estudio se realizó un análisis estadístico para comprobar la naturaleza de las variables estudiadas mediante el programa estadístico InfoStat® (Di Rienzo *et al.*, 2015). La prueba utilizada fue Shapiro-Wilks y los resultados (Tabla N°4) mostraron que los datos no distribuyen normal, lo que coincide con la literatura que indica que las variables de recuento tienen una distribución no normal (Long, 1997; Vives, 2002; Salinas *et al.*, 2009).

En relación con lo anterior y para medir el grado de asociación entre las variables estudiadas de cada método de recuento de leucocitos totales (variables cuantitativas), se utilizó el coeficiente de correlación no paramétrico de Spearman, cuyo resultado fue 0,65 (tabla N°5) lo que indica una correlación positiva entre ambas variables (Balzarini *et al.*, 2008). En un

estudio similar realizado por Véliz (2013) en individuos de *Salmo salar*, se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,23 lo que también indica una correlación positiva, pero muy inferior a lo registrado en este estudio. Una de las causas que pudo haber conducido a ese resultado pudo ser la modificación en metodología utilizada. En consideración a que nuestro trabajo se realizó bajo los protocolos validados en la literatura para recuentos celulares, tanto directos como indirectos, resultó un coeficiente de correlación más cercano a  $\geq 0,80$  que es la correlación aceptada para validar una técnica (Tvedten, 1994; Lumsden, 2000; Flatland *et al.*, 2010; Vap *et al.*, 2012). Lo anterior señala que sería posible estimar recuentos celulares basados en metodologías indirectas si se efectúan bajo los estándares técnicos descritos anteriormente.

Basados en los resultados obtenidos se abrió la posibilidad de proyectar un modelo predictor de promedios de recuento directo a partir de un recuento indirecto en frotis sanguíneo. Para ello, se indagó más profundamente en otras pruebas estadísticas no consideradas dentro de la metodología de este estudio.

El modelo lineal generalizado es considerado dentro de los modelos estadísticos, la mejor opción para estudiar las variables de recuento, y dentro de éste el más utilizado es el modelo de regresión de Poisson, ya que la principal bondad de éste es que es capaz de capturar la naturaleza discreta y no negativa de los datos de recuento (Vives, 2002; Salinas *et al.*, 2009).

El programa estadístico InfoStat® (Di Rienzo *et al.*, 2015) indica que en éste estudio existe sobredispersión en los datos (Anexo 6), lo que según Vives (2002) puede estar directamente relacionado con el tamaño de la muestra, a mayor tamaño de la muestra, mayor será la dispersión de los datos. Ante la situación de sobredispersión lo correcto es realizar un ajuste al modelo de Poisson, por lo que en este estudio se utilizó el ajuste de Quasi-Poisson, modelo adecuado para trabajar con variables de respuesta de recuento (Long, 1997; Vives, 2002; Berdugo, 2010; Seoane, 2014).

Basado en el modelo de Quasi-Poisson se puede realizar un modelo predictivo de recuento de leucocitos totales en cámara de Neubauer (método directo de laboratorio) utilizando la técnica del frotis sanguíneo (método indirecto de terreno). Al ser variables de recuento y bajo la premisa de que no distribuyen normal, es que la ecuación que resulta no se puede expresar

de forma lineal y por lo tanto hay que utilizar una función de enlace para expresarla (López y Ruiz, 2011). El modelo de Quasi-Poisson utiliza el logaritmo como función de enlace entre ambas variables de recuento celular resultando la siguiente ecuación:

$$g(\gamma) = \beta_0 + \beta_1 X$$

$$\text{Log}(\gamma) = \beta_0 + \beta_1 X$$

, donde "g" corresponde a la función de enlace que se debe ocupar en un modelo lineal generalizado, y que es reemplazada por una función logarítmica representada como "Log" (López y Ruiz, 2011). La variable "γ" corresponde a las variables de la cámara de Neubauer y la covariable "X" corresponde a las variables del frotis sanguíneo.

Los datos se modelaron por el programa estadístico InfoStat® (Di Rienzo *et al.*, 2015) en la librería *Stats* de la función R del programa. Dada la fórmula descrita, este programa permitió estimar  $\beta_0$  y  $\beta_1$ , obteniendo la siguiente fórmula:

$$g(\gamma) = \beta_0 + \beta_1 X$$

$$\text{Log}(\gamma) = \beta_0 + \beta_1 X$$

$$\text{Log}(\gamma) = \frac{8,9497 + 0,00002034X}{e}$$

$Y = e^{(8,9497 + 0,00002034 * X)}$
-------------------------------------

Y = recuento promedio estimado de leucocitos totales

e = exponencial de la función

X = recuentos promedio de leucocitos por individuo en frotis sanguíneo

El resultado final es un modelo predictivo de recuento de leucocitos totales cuya fórmula permite predecir los valores promedios de los recuentos en la cámara de Neubauer (RTL-

CN) a partir de los recuentos realizados en los frotis sanguíneos (RTL-FS) mediante la fórmula propuesta por Walberg (2001). Basados en la información disponible actualmente en la literatura en referencia a recuentos celulares indirectos en sangre de peces, este sería el primer modelo matemático descrito con el objetivo principal de generar una herramienta diagnóstica que pueda ser utilizada en el monitoreo en terreno de los cultivos de salmónidos.

Sin embargo, en virtud de lo expuesto, se considera pertinente realizar nuevos estudios y probar este modelo predictor bajo la metodología utilizada en la presente memoria de título.

## CONCLUSIONES

1. La correlación entre las variables de RTL-CN y RTL-FS resultó ser positiva (0,65) pero no suficientemente alta como para validar el conteo de leucocitos por frotis sanguíneo como una alternativa del método clásico en cámara de Neubauer.
2. Se propone el primer modelo matemático predictor de recuento de leucocitos totales a partir de recuentos indirectos en frotis sanguíneo en trucha arcoíris.
3. Se plantea la necesidad de probar el modelo propuesto a fin de generar instrumentos que permitan un mejor apoyo al diagnóstico y control de enfermedades en trucha arcoíris.

## **BIBLIOGRAFÍA**

**ALLISON, R; MAINKOTH, J.** 2007. Hematology without the numbers: In-Clinic Blood Film Evaluation. *Vet. Clin. Small. Anim.* 37:245-266.

**ANDERSON, D; BARNEY, P.** 1991. The role of the diagnostic laboratory in fish disease control. *Annu. Rev. Fish. Dis.* 1:41-62.

**ARNÉS, V; BÖHMWLAD, H.** 2012. Técnicas hematológicas en peces. In: Hematología de Salmonídeos. Valdivia, Chile. pp 33-39.

**ARNOLD, J.; MATSCHE, M.; ROSEMARY, K.** 2014. Preserving whole blood in formalin extends the specimen stability period for manual cell counts for fish. *Vet. Clin. Pathol.* 43(4):13-20.

**BALZARINI, M; GONZALEZ, L; TABLADA, M; CASANOVES, F; DI RIENZO, J; ROBLEDO, C.** 2008. InfoStat®. Manual del Usuario. Editorial Brujas. Córdoba, Argentina. 336 p.

**BERDUGO, E.** 2010. Estudio comparativo entre los modelos Poisson-Normal y Binomial Negativo log-lineal mixto, para datos de conteos longitudinales. Tesis Magister en Ciencias Estadísticas. Bogotá, Colombia. Departamento de Estadística, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia. 84 p.

**BLACK, M.** 2000. Collection of Body Fluid. In: Ostrander, G. The Laboratory Fish. Academic press. Londres, Reino Unido. pp 498-501.

**BUENAÑO, M.** 2010. Hemograma de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en tres etapas de producción en la cuenca alta de la provincia del Napo, Ecuador. *Bol. Téc.* 9, Serie Zoológica 6:1-14.

**CENTENO, L; SILVA, R; BARRIOS, R; SALAZAR, R; MATUTE, C; PÉREZ, J.** 2007. Haematological characteristics of the cachama (*Colossoma macropomum*) in three phases of growth in Delta Amacuro state, Venezuela. *Zootec. Trop.* 25(4): 237-243.

**CONROY, D.** 1972. Studies on the hematology of the Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *J. Zool.* (30):101-127.

**COPETE-SIERRA, M.** 2013. Aspectos generales de la evaluación hematológica en fauna silvestre y no convencional. Memorias de la conferencia interna en medicina y aprovechamiento de fauna silvestre, exótica y no convencional. 9(1): 17-55.

**CORREA, J; GARRIDO, A; PRIETO, M; ATENECIO, V; PARDO, S.** 2009. Caracterización de células sanguíneas y parámetros hematológicos en blanquillo *Sorubim cuspicaudus*. Zootec. Trop. 27(4): 393-405.

**CRAY, C; ZAIAS, J.** 2004. Laboratory Procedures. Vet. Clin. Exot. Anim. 7:487–518.

**DACIE, J.; LEWIS, S.** 1991. Practical haematology. Churchill Livingstone, Londres. 556 p.

**DE PEDRO, N; GUIJARRO, A; LÓPEZ, M; MARTÍNEZ, R; ALONSO, M; DELGADO, M.** 2004. Parámetros hematológicos y bioquímicos en la Tenca (*Tinca tinca*): Ritmos diarios y estacionales. In: Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. Madrid, España. 10 Noviembre 2004 – 10 Diciembre 2004. Dpto. de Fisiología. Fac. de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense. pp 173-190.

**DI RIENZO, J; CASNOVES, F; BALZARINI, M; GONZÁLEZ, L; TABLADA, M; ROBLEDO, C.** 2015. *InfoStat*®. Versión 2015. Grupo InfoStat. FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.

**ESTEBAN, M; CUESTA, A; CHAVES-POZO, E; MESEGUER, J.** 2015. Phagocytosis in teleosts. Implications of the new cells involved. Biology 4:907-922.

**FAO.** 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura. Roma, Italia. 226 p.

**FLATLAND, B; FREEMAN, K; FRIEDRICHS, K.** 2010. ASVCP quality assurance guidelines: control of general analytical factors in veterinary laboratories. Vet. Clin. Pathol. 39:264-277.

**GÁLVEZ, C; RAMÍREZ, G; HENRY, J.** 2009. The Clinic Laboratory in Hematology of Exotic Birds. Biosalud. 8:178-188.

**HARR, K; RASKIN, R; HEARD, D.** 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.

**HIDALGO, E; ALCAYAGA, V; ZEGPI, R.** 2014. Análisis de carcasas de pollos de carne oscura y carne pálida en una planta faenadora. Laboratorio de Patología Aviaria, Universidad de Chile. Santiago, Chile. 37 p.

**HRUBEC, T; SMITH, S.** 2010. Hematology of Fishes. In: Weiss, D.; Wardrop, K. Schalm's Veterinary Hematology. 6<sup>ta</sup> ed. Wiley-Blackwell. Iowa, USA. pp 994-1003.

**KEKIC, H; IVANC, A.** 1982. New direct method for counting fish blood cells. *Ichthyologia.* 14(1):55-58.

**LATIMER, K; BIENZELE, D.** 2010. Determination and Interpretation of the Avian Leukogram. In: Weiss, D; Wardrop, K. *Veterinary Hematology.* 6<sup>o</sup> ed. Wiley-Blackwell. Iowa, USA. pp. 345-346.

**LINDSEY, J.** 1995. *Introductory Statistics: A modelling approach.* New York: Oxford University Press.

**LONG, J.** 1997. *Regression models for categorical and limited dependent variables.* Advanced quantitative techniques in the social sciences series. Sage publications. California, USA. 301 p.

**LÓPEZ, E; RUIZ, M.** 2011. Análisis de datos con el modelo lineal generalizado. Una aplicación con R. Universidad de Málaga. *Rev. Esp. Pedagog.* 69(248): 59-80.

**LUMSDEN, J.** 2000. Quality control. In: Feldman, B; Zinkl, J; Jain, N. Schalm's Veterinary Hematology. 5<sup>o</sup> ed. Baltimore, MD: Lippincott, William and Wilkins. pp 16-19.

**MARINO, G; DI MARCO, P; MANDICH, A; FINOIA, M; CATAUDELLA, S.** 2001. Changes in serum cortisol, metabolites, osmotic pressure and electrolytes in response to different blood sampling procedures in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Appl. Ichthyol.* 17:115-120.

- MARTÍNEZ, A; LAVÍN, S; CUENCA, R.** 2011. Hematology and blood cytology in reptiles. *Clin. Vet. Peq. Anim.* 31(3):131-141.
- MORERA, D; ROHER, N; RIBAS, L; BALASCH, J; DOÑATE, C; CALLOL, A; BOLTAÑA, S; ROBERTS, S; GOETZ, G; GOETZ, F; MACKENZIE, S.** 2011. RNA-Seq reveals an integrated immune response in nucleated erythrocytes. *Plos. One.* 6(10). 9 p.
- NATT, M; HERRICK, C.** 1952. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leukocytes of the chicken. *Poult. Sci.* 31:735 – 738.
- OLABUENAGA, S.** 2000. Sistema inmune en peces. *Gayana* 64(2):205-215.
- PÉREZ, R; ESTEPA, J; MENDOZA, F.** 2011. Citología sanguínea en pequeños animales. Hallazgos más comunes y su interpretación. Análisis y estudio del frotis sanguíneo. Córdoba, España. Universidad de Córdoba. Fac. Cs. Veterinaria. Depto. Medicina y Cirugía Animal. 9 p.
- PITOMBEIRA, M.; MARTINS, J.; FURTADO, E.** 1968. Hematology of the Atlantic thread herring, *Opisthonema oglinum* (Le Sueur). Universidad Fed. Ceará. Arq. Est. Biol. Mar. 8(2):111-116.
- ROBERTS, R.** 1989. *Fish Pathology*. 2° ed. London. Saunder company. pp 374-405.
- RUDOLPH, W; VILLOUTA, G.** 2003. Examen de la Sangre. In: Hematología y Citología Clínica Animal. 2° ed. Departamento de Patología Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. Santiago, Chile. pp 7-10.
- RUIZ, I; FERNÁNDEZ, A; BLAS, I.** 2003. El sistema inmune de los teleósteos (III): Respuesta inmune inespecífica. *AquaTIC*. 18:33-38.
- RUSSO, E; MC ENTEE, L; APPLGATE, L; BAKER, J.** 1986. Comparison of two methods for determination of White blood cell counts in macaws. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 189(9):1013-1016.
- SALINAS, A; MANRIQUE, B; SOSA, S.** 2009. Análisis estadístico para datos de conteo: aplicaciones para el uso de los servicios de salud. *Salud Pública Méx.* 51(5):397-406.

- SAN MARTÍN, B; GALLARDO, A; MEDINA, P.** 2014. Manual de buenas prácticas en el uso de antimicrobianos y antiparasitarios en la salmonicultura chilena. 2° ed. Laboratorio de Farmacología Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. Santiago, Chile. 52 p.
- SATCHELL, G.** 1991. Physiology and form of fish circulation. Cambridge Univ. Press. Australia. 235 p.
- SEOANE, J.** 2014. ¿Modelos mixtos (lineales)? Una introducción para el usuario temeroso. Madrid, España. Departamento de Ecología de la Universidad Autónoma de Madrid. 23 p.
- SIERRA, E.; ESPINOSA DE LOS MONTEROS, A.; REAL, F.; HERRÁEZ, P.; RODRIGUEZ, P.; FERNÁNDEZ, A.** 2011. Histología y patología de los peces parte II: Infecciones víricas, bacterianas y micóticas. Unidad de Histología y Anatomía patológica. Facultad de Veterinaria. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Gran Canaria, España. 12 p.
- STOSKOPF, M.** 1992. Clinical Pathology. **In:** Fish Medicine. Elsevier. Philadelphia, USA. pp 113-131.
- STOSKOPF, M.** 1993. Fish medicine. Saunders, Philadelphia, USA. 245 p.
- TAVARES-DIAS, M.; MATAQUEIRO, M.; PERECIN, D.** 2002. Total leukocyte counts in fishes by direct or indirect methods?. B. Inst. Pesca. 28(2):155-161.
- TRONCOSO, C.** 1997. Caracterización hematológica de trucha arcoíris juvenil (*Oncorhynchus mykiss*) en sistema de cultivo intensivo en la zona central. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. Santiago, Chile. 75 p.
- TVEDTEN, H.** 1994. The Complete Blood Count and Bone Marrow Examination: General Comments and Selected Techniques. **In:** Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods. 2ª ed. Saunders. Philadelphia, Estados Unidos. pp 11-30.
- VAP, L; HARR, K; ARNOLD, J; FREEMAN, K; GETZY, K; LESTER, S; FRIEDRICHS, K.** 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.* 41:8-17.

**VÉLIZ, G.** 2013. Validación de la cuenta total de leucocitos en frotis sanguíneo como alternativa de campo al uso del hemocitómetro en especímenes de *Salmo Salar* sanos. Tesis Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile. Fac. Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 31 p.

**VIVES, J.** 2002. El diagnóstico de la sobredispersión en modelos de análisis de datos de recuento. Tesis doctoral. Barcelona, España. Departamento de psicología de las ciencias de la salud. Facultad de psicología. Universidad Autónoma de Barcelona. 163 p.

**WALBERG, J.** 2001. White blood cell counting techniques in birds. *Semin. Avian. Exot. Pet. Med.* 10(2):72-76.

**WITTWER, F.** 2012. Generalidades de Hematología. **In:** Hematología de Salmonídeos. Valdivia, Chile. pp 1-3.

## **Anexo N° 1: Protocolo que se realizó al momento del traslado de los peces hacia la Unidad de Patología de Organismos Acuáticos del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.**

### **Consideraciones Previas:**

- Medir condiciones dónde van a llegar y de dónde provienen los peces.
- Ver lugar físico donde van a llegar los peces, que esté en su correcto funcionamiento. Regular niveles de agua, que agua fluya por sistema (cañerías permeables).
- Disponibilidad de alimento para peces.

Realizar mediciones físico-químicas del agua:

- Oxímetro: Medir parámetros como Temperatura (°C), Saturación Oxígeno (%), Concentración de Oxígeno (mg/dL) (lo óptimo es de 6 a 9 mg/dL). Lo ideal es que estos parámetros sean lo más similares posible a modo de disminuir el estrés.

### **Transporte:**

Elementos Necesarios:

- Bolsas de Basura.
- Abrazaderas Plásticas.
- Recipiente Plástico.
- Quechas.
- Oxígeno (Manguera y difusor).
- Medio de transporte (carretilla o auto).
- Solución desinfectante (medida de bioseguridad).

Procedimiento: La bolsa de basura limpiarla de posibles residuos que pueda contener (lavar), llenar de agua del mismo sistema de donde provienen los peces, se carga la cantidad de peces y se procede a través del difusor a saturar de oxígeno el agua y el ambiente donde se trasladaran los peces. Luego se sella con una amarra plástica para evitar que salga el oxígeno y posteriormente se coloca en el recipiente plástico que se utilizará en el transporte. El tiempo estimado de transporte será de 20 minutos aproximadamente.

### **Recepción en la Unidad de Animales Acuáticos Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile:**

Elementos Necesarios:

- Balanza digital que mida en gramos.
- Recipiente plástico.
- Solución Anestésica (Dolical© 80).

A la llegada al laboratorio se desinfectará el recipiente de transporte, mediante la solución desinfectante que se considere pertinente como medida de bioseguridad.

Luego los peces serán pesados y distribuidos (en el estanque o en los estanques), sin depositar agua de la bolsa de donde provienen. Descartar el agua en la cual se transportó a los peces.

Valores Oxímetro (Modelo Hanna Oxy-check©):

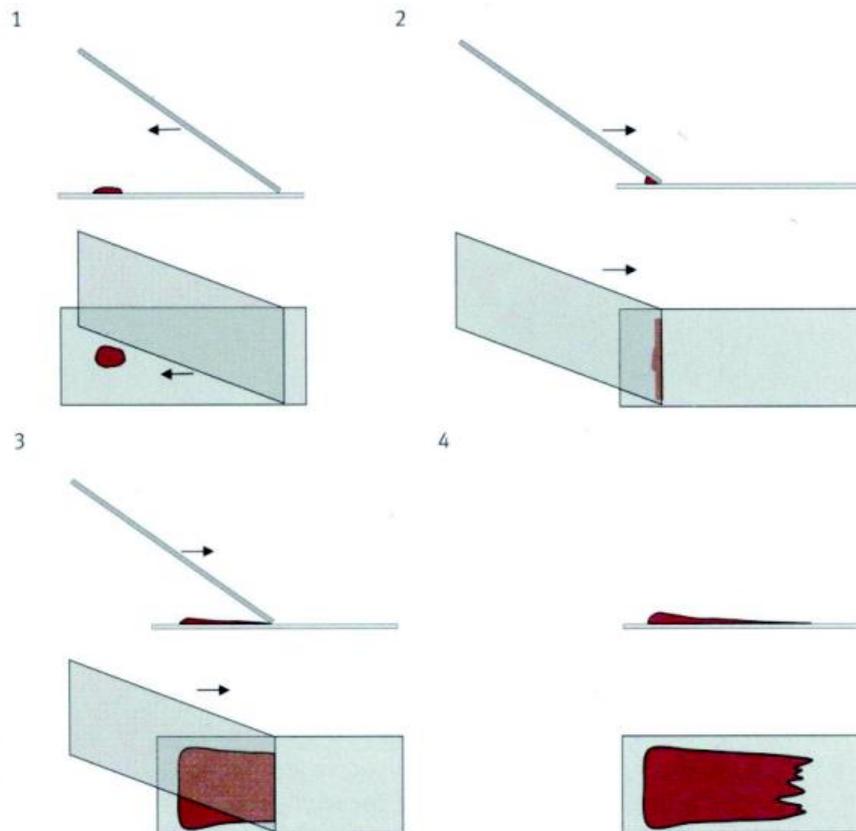
-Saturación Oxígeno: 85%.

-Concentración de Oxígeno: 8.7 mg/dL.

-Temperatura: 9,6 °C.

## Anexo N°2: 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 N°3: Recuento Directo Cámara de Neubauer** (Hrubec y Smith, 2010)

#### **Material**

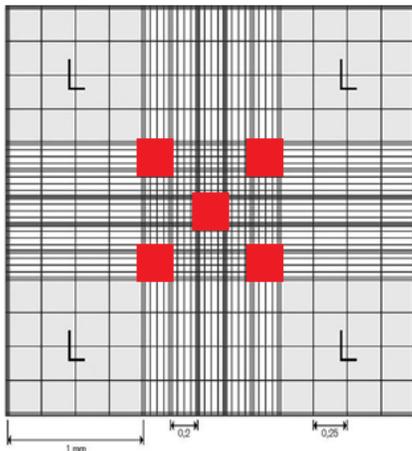
1. diluyente de Natt-Herrick
2. micropipeta 1000, 10 y 20  $\mu\text{L}$
3. puntas desechables para micropipeta
4. tubos eppendorf 1,5 mL
5. Pipeta Pasteur
6. Microscopio óptico Carl Zeiss©

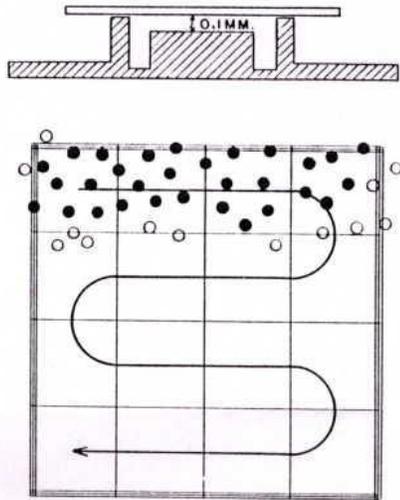
#### **Procedimiento**

1. Colocar 990  $\mu\text{L}$  de diluyente dentro de un tubo eppendorf.
2. Adicionar 10  $\mu\text{L}$  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 recuento de células**

1. Ubicar en la cámara la superficie correspondiente para el recuento de eritrocitos o leucocitos.
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, como se observa en la siguiente figura:





### **Recuento de Leucocitos**

Los leucocitos y trombocitos se tiñen de color púrpura en sus diferentes tonos. Con este método, ambos tipos celulares se cuentan al mismo tiempo, pero es más exacto diferenciarlos en la cuenta diferencial de células en el frotis sanguíneo y no en la cámara de Neubauer. Las células se cuentan de acuerdo a la pauta general de cuenta de células en uno o los cuatro cuadrados primarios de las esquinas de la cámara indicadas con la letra L. Cada cuadrado primario contiene 16 cuadrados secundarios. El número de cuadrados primarios que se cuentan dependerá del número de leucocitos presentes en la muestra lo que está también relacionado con la especie.

Si se cuenta un cuadrado primario se debe multiplicar el resultado por 1.000 para obtener el número de leucocitos y trombocitos totales por  $\mu\text{L}$ . Si se cuentan 2 cuadrados primarios se debe multiplicar el resultado por 500 para obtener el número de leucocitos y trombocitos totales por  $\mu\text{L}$ . Si se cuentan 3 cuadrados primarios se debe multiplicar el resultado por 333 para obtener el número de leucocitos y trombocitos totales por  $\mu\text{L}$ . Si se cuentan 4 cuadrados primarios se debe multiplicar el resultado por 250 para obtener el número de leucocitos y trombocitos totales por  $\mu\text{L}$ .

### **Recuento diferencial de células en frotis sanguíneo**

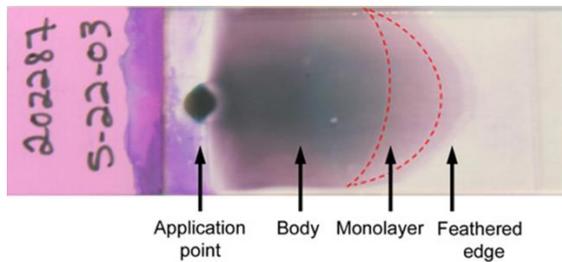
Una vez que el frotis sanguíneo se ha teñido y secado, se debe proceder a montar en un portaobjeto, o bien, a cubrir con cubreobjeto. El procedimiento dependerá del método escogido para el frotis y se realiza con medio de montaje histológico.

La morfología de las células que se observan al frotis, dependerá de varias situaciones como calidad de la muestra, uso de anticoagulante, tinción y especie, entre otras. Por ello se recomienda revisar

previamente la morfología normal de la especie que se analizará para luego revisar la muestra. Es muy importante examinar todo el extendido antes de comenzar con la identificación en la cuenta diferencial.

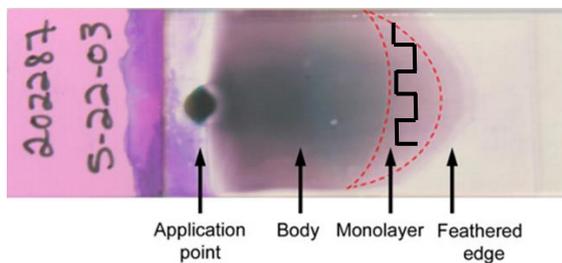
A continuación se debe identificar la zona de monocapa celular ubicada en el último tercio del frotis y cercana al borde (Figura 1a). Adicionalmente se debe seguir un orden de recuento con la finalidad de no superponer áreas (Figura 1b).

**Figura 1a:** Frotis sanguíneo en portaobjeto que muestra zona de monocapa donde deben realizarse los recuentos celulares tanto para el estudio diferencial como para las estimaciones en recuentos indirectos.



[www.eclinpath.com](http://www.eclinpath.com)

**Figura 1b:** Frotis sanguíneo en portaobjeto que muestra el orden de recuento dentro de la zona de monocapa.



[www.eclinpath.com](http://www.eclinpath.com)

Durante el procedimiento de deben contar un mínimo de 100 leucocitos totales y separadamente los trombocitos. Luego, se calculan los valores porcentuales de cada uno y se resta el porcentaje de trombocitos al total obtenido en la cámara de leucocitos y trombocitos para obtener separadamente la cuenta total de leucocitos y trombocitos.

#### Anexo N°4: Medidas de resumen según método de recuento celular

Medidas resumen	RTL-CN	RTL-FS
<b>N</b>	104,00	104,00
<b>Media</b>	19498,95	43552,40
<b>D.E.</b>	9335,77	14016,51
<b>Var (n-1)</b>	87156536,05	196462542,71
<b>Var (n)</b>	86318492,43	194573479,80
<b>E.E.</b>	915,45	1374,43
<b>CV</b>	47,88	32,18
<b>Mín</b>	5765,00	11750,00
<b>Máx</b>	58604,00	87150,00
<b>Mediana</b>	18215,50	42500,00
<b>Q1</b>	12125,00	33700,00
<b>Q3</b>	23250,00	53200,00
<b>Suma</b>	2027891,00	4529450,00
<b>Suma Cuad.</b>	48518872327,00	217504077500,00
<b>SCC</b>	8977123212,76	20235641899,04
<b>Asimetría</b>	1,51	0,54
<b>Kurtosis</b>	3,23	0,37
<b>P (05)</b>	8623,00	22950,00
<b>P (10)</b>	10047,00	27050,00
<b>P (25)</b>	12125,00	33700,00
<b>P (50)</b>	18140,00	42500,00
<b>P (75)</b>	23250,00	53200,00
<b>P (90)</b>	28695,00	59850,00
<b>P (95)</b>	35654,00	66100,00
<b>MAD</b>	5672,00	9650,00
<b>Datos faltantes</b>	0,00	0,00

RTL-CN: Recuento total leucocitario mediante método directo en cámara de Neubauer.

RTL-FS: Recuento total leucocitario mediante método indirecto en frotis sanguíneo.

N: tamaño de la muestra.

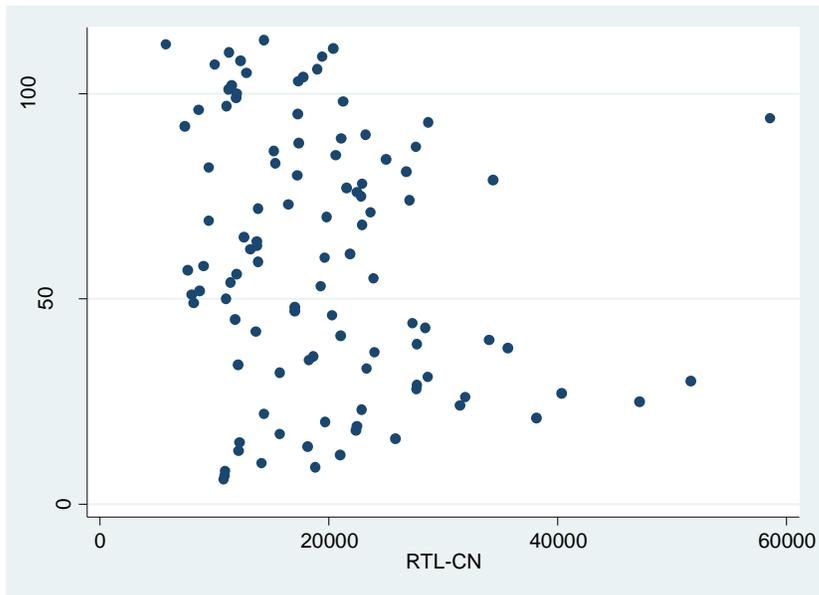
Mín: Valor mínimo.

Máx: Valor máximo.

CV: Coeficiente de Variación.

**Anexo N°5: Gráficos de dispersión independientes para las variables CN y FS:**

**Gráfico de dispersión obtenido del RTL-CN.**



**Gráfico de dispersión obtenido del RTL-FS.**

