

**UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONOR ORREGO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



Caracterización leucocitaria en extensiones sanguíneas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) bajo crianza no intensiva en el sector César Vallejo, distrito de Agallpampa, provincia de Otuzco, en el departamento de La Libertad

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

AMELIA MISHHELL QUISPE ISLA

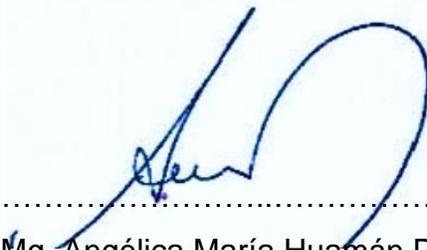
TRUJILLO, PERÚ

2020

La presente tesis ha sido revisada y aprobada por el siguiente Jurado:



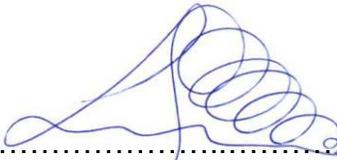
Dr. Wilson Lino Castillo Soto
PRESIDENTE



MV. Mg. Angélica María Huamán Dávila
SECRETARIA



Ing. Marco Antonio Rojas Paredes
VOCAL



MV. Mg. César Leopoldo Lombardi Pérez
ASESOR

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a:

Mi hijo, que con su grande amor
ilumina mis días.

A mis padres, por su infinita
paciencia, cariño y comprensión.

A mis hermanos, quienes me
acompañan siempre desde donde
estén.

A mis abuelos, por darme palabras
de aliento cuando lo necesitaba.

A mis amigos incondicionales que
siempre estuvieron a pesar del
tiempo y la distancia.

A mis maestros y compañeros que
compartimos la misma pasión por la
veterinaria.

A mi enamorado, por darme paz y
felicidad.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor MV. Mg. César Lombardi Pérez; por su paciencia, por guiarme y apoyarme en todo momento, por ser un gran mentor y por compartir sus conocimientos y sabiduría para poder desarrollar este proyecto.

A los miembros del jurado; los cuales me brindaron sus consejos para direccionar este proyecto y por permitirme alcanzar una meta más.

A mis padres; por amanecer y trasnochar conmigo todo el tiempo que duró esta travesía.

A mis amigos y colegas Fabrizio, Jhaira, Christian y Andrea; gracias por el apoyo que me dieron durante el desarrollo de este proyecto.

A la familia Meléndez Ramos; por ayudarme de una manera desinteresada en todo el proceso de la ejecución, infinitas gracias por su buena voluntad.

A Boris; gracias por ayudarme estos últimos años, por apoyarme en todo lo que estaba a tu disposición y por no dejarme caer.

ÍNDICE

	Páginas
CARÁTULA.....	i
APROBACIÓN POR EL JURADO DE TESIS	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE	v
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE ANEXOS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	1
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. La trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	3
2.2. La hematología.....	6
2.3. Características celulares sanguíneas.....	8
III. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1. Lugar de investigación	11
3.2. Animales de estudio	11
3.3. Manejo	11
3.4. Toma de muestra	12
3.5. Variable a evaluar	12
3.6. Metodología	12
3.7. Análisis estadístico.....	13
IV. RESULTADOS	14
V. DISCUSIÓN.....	18

VI. CONCLUSIONES	21
VII. RECOMENDACIONES.....	22
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	23
IX. ANEXOS.....	28

ÍNDICE DE CUADROS

	Páginas
Cuadro 1. Cosecha de truchas arco iris según departamento, 2012-2017 (t)	5
Cuadro 2. Valores promedios de leucocitos totales de trucha arco iris, evaluado a 32 semanas de edad	14

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Micrografía de frotis sanguíneo para recuento indirecto de leucocitos. Tinción Giemsa 1000x. Letra “a” indica un monocito maduro. Letra “b” indica un monoblasto	15
Figura 2. Micrografía de frotis sanguíneo para recuento indirecto de leucocitos. Tinción Giemsa 1000x. Letra “a” indica un linfocito activado	15
Figura 3. Micrografía de frotis sanguíneo para recuento indirecto de leucocitos. Tinción Giemsa 1000x. Se observan linfocitos grandes activados (flechas rojas), monocitos maduros (flechas azules) y un neutrófilo (círculo azul)	16
Figura 4. Micrografía de frotis sanguíneo. Recuento indirecto. Tinción Giemsa 1000x. La flecha negra señala eritrocitos inmaduros o policromatocitos. La flecha morada señala eritrocitos maduros. Las flechas rojas señalan linfocitos	16
Figura 5. Micrografía de frotis sanguíneo para recuento indirecto de leucocitos. Tinción Giemsa 1000x. Las flechas rojas señalan eritrocitos. Las flechas azules señalan linfocitos maduros. La punta de flecha señala un grupo de plaquetas	17
Figura 6. Micrografía de frotis sanguíneo. Recuento indirecto. Tinción Giemsa 1000x. Las flechas rojas señalan los mielocitos. Las flechas azules señalan los granulocitos maduros	17

ÍNDICE DE ANEXOS

	Páginas
Anexo 1. Resultado del recuento total de leucocitos del primer muestreo	28
Anexo 2. Resultado del recuento total de leucocitos del segundo muestreo	29
Anexo 3. Resultados de la estadística descriptiva de los datos del primer muestreo	30
Anexo 4. Resultados de la estadística descriptiva de los datos del segundo muestreo	30
Anexo 5. Extracción de sangre vía punción en vena caudal	31
Anexo 6. Realización del frotis sanguíneo	33
Anexo 7. Elaboración de la tinción Giemsa utilizada en las muestras	34
Anexo 8. Recorrido de la lámina para la lectura microscópica	35

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo reconocer, diferenciar y conocer factores que alteren la serie leucocitaria de truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) por medio de extensiones sanguíneas, dado que éstas son una herramienta útil y primordial en este tipo de producción para tener una referencia sobre el estado de salud y tener un control sanitario adecuado. Se realizó la evaluación hematológica a un total de 90 individuos de truchas arco iris localizado en el sector César Vallejo, perteneciente al distrito de Agallpampa, provincia de Otuzco, del departamento de La Libertad. Para esta evaluación se extrajo sangre en tubos con heparina litio a cada espécimen en dos ocasiones, la primera extracción fue para los primeros 45 especímenes y la segunda extracción se realizó tres días después a los 45 especímenes restantes; finalizado la extracción de sangre, cada pez fue sacrificado. Se realizó el recuento leucocitario total en cada extensión sanguínea por medio del método indirecto en frotis sanguíneo, obteniendo como resultados en el primer muestreo un promedio de 38 738.99 células/uL, una desviación estándar de 12 396.02 y un coeficiente de variación de 32 %; mientras que en el segundo muestreo el número de leucocitos promedio fue 46 721.11 células/uL, una desviación estándar de 16 382.33 y un coeficiente de variación de 35.06 %, siendo el promedio del segundo muestreo mayor que del primero; y utilizando las mismas extensiones sanguíneas se realizó el reconocimiento y caracterización de las células presentes en las truchas arco iris. Se concluyó que las extensiones sanguíneas permiten reconocer y diferenciar la serie leucocitaria en truchas arco iris y se observó que el factor estrés altera la distribución de células blancas en sangre.

ABSTRACT

The aim of this study was to recognize, differentiate and know factors that alter the leukocyte series of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) through blood extensions, since these are a useful and essential tool in this type of production to have a reference on health and have adequate sanitary control. A hematological evaluation was carried out a total of 90 individuals of rainbow trout that were located in the César Vallejo sector, belonging to the district of Agallpampa, province of Otuzco, of the department of La Libertad. For this evaluation blood was drawn in heparinized tubes lithium to each specimen twice, the first extraction was for the first 45 specimens and the second extraction was performed three days after the remaining 45 specimens; after the blood collection, each fish was sacrificed. The total leukocyte count in each blood extension was performed by means of the indirect blood smear method, obtaining as a result in the first sampling an average of 38 738.99 cells / μL , a standard deviation of 12 396.02 and a coefficient of variation of 32 %; while in the second sampling the average number of leukocytes was 46 721.11 cells / μL , a standard deviation of 16 382.33 and a coefficient of variation of 35.06 %, the average of the second sampling being greater than the first; and using the same blood extensions, recognition and characterization of the cells present in rainbow trout was carried out. It was concluded that blood extensions allow us to recognize and differentiate the leukocyte series in rainbow trout and it was observed that the stress factor alters the distribution of white blood cells

I. INTRODUCCIÓN

La trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) vive en aguas frías y es capaz de ocupar diversos hábitats, es una especie nativa de América del Norte, puede soportar un amplio rango de temperaturas (de 0 a 27 °C), pero el desove y el crecimiento se producen en un rango más estrecho (de 9 a 14 °C). La temperatura y la disponibilidad de alimentos influyen en el crecimiento y la maduración, por lo que la edad de maduración puede variar. En el río, las truchas silvestres se alimentan de insectos terrestres y acuáticos, moluscos, huevos de peces y peces pequeños, así como camarones y crustáceos de agua dulce, que le aportan los carotenoides responsables del color rosado-anaranjado en la carne (Arregui, 2013).

La utilización de la hematología veterinaria en peces constituye una herramienta útil para evaluar los cambios fisiológicos y/o patológicos que acontecen en las células sanguíneas constituyentes del sistema inmunológico del pez. A diferencia de otras especies animales, los análisis hematológicos en peces no son solicitados como una prueba rutinaria; sin embargo, éstos son pieza clave para detectar importantes aspectos ligados a la salud y dar a conocer enfermedades que alteren los componentes celulares de la sangre (Rozas y otros, 2015).

Teniendo en cuenta que existen muchas especies acuícolas y una gran diversidad ecológica, la relación de la morfología celular sanguínea y su función crean un panorama complejo para su aplicación en el diagnóstico (Wittwer, 2012). Otro factor que se considera es la presencia de eritrocitos y trombocitos nucleados junto con los leucocitos de los peces, los cuales no permiten el uso de equipos automatizados limitantes, por lo cual se realiza el recuento celular de forma manual. De manera general, en peces se describen seis tipos de leucocitos los cuales varían su porcentaje dependiendo de la especie y de las condiciones fisiológicas del pez (Stachura y Traver, 2011).

El presente estudio tuvo como objetivo reconocer, diferenciar y conocer factores que alteren la serie leucocitaria de truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) por medio de extensiones sanguíneas, las cuales pueden ser utilizadas como una alternativa en campo como indicativo del estado de salud de truchas arco iris.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. La trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)

La acuicultura se desarrolla en el mundo como un sistema productivo que sustituye en gran medida a la explotación pesquera y se proyecta como la respuesta para satisfacer las necesidades alimentarias de la humanidad (FAO, 2018). La trucha arco iris es una especie introducida que se ha adaptado bien a las condiciones climáticas de aguas frías de la sierra peruana, es una de las especies más importantes en la acuicultura del país, su producción está destinada al consumo local y su contribución con el desarrollo de las zonas donde se asienta es limitada (Maximixe, 2010).

La trucha arco iris es nativa de las cuencas que drenan al Pacífico en Norte América, desde 1874 ha sido introducida en las aguas de todos los continentes excepto la Antártica, con propósitos recreacionales para pesca deportiva y para acuicultura. La producción mundial creció a partir de los años 50 con el desarrollo de los alimentos peletizados, su cultivo en las cuencas altiplánicas de muchos países tropicales y sub-tropicales de Asia, este de África y Sudamérica han permitido el desarrollo de varios linajes o cepas locales domesticadas, y otras han surgido por selección masiva y entrecruzamiento. Las truchas no desovan naturalmente en sistemas de cultivo, de modo que los juveniles deben ser obtenidos ya sea por desove artificial en un criadero o por recolección de huevos de poblaciones silvestres. Las hembras son capaces de producir hasta 2000 huevos/kg de peso corporal con un diámetro de 3 a 7 mm. La mayoría de los peces desova sólo una vez (particularmente en primavera), aunque la crianza selectiva y el ajuste del fotoperiodo han producido cepas de criadero que pueden madurar más temprano y desovar todo el año; las larvas están bien desarrolladas al momento de la eclosión, la especie puede soportar variaciones de temperatura de 0-27 °C, pero

el desove y crecimiento ocurren en temperaturas de 9-14 °C, la temperatura óptima del agua para el cultivo de trucha arco iris está por debajo de 21 °C (FAO, 2009).

En forma natural las truchas adultas se alimentan de insectos acuáticos y terrestres, moluscos, crustáceos, huevos de peces y otros peces pequeños, pero el alimento más importante son los camarones de agua dulce que contienen los pigmentos carotenoides responsables del color rosado-anaranjado en la carne. En acuicultura, la inclusión en los alimentos de los pigmentos sintéticos astaxantina y cantaxantina causa que se produzca esta coloración rosada es un pez resistente y fácil de desovar, de crecimiento rápido, tolerante a una amplia gama de ambientes y manipulaciones; los alevines usualmente comen zooplancton pueden ser iniciados fácilmente en la alimentación con una dieta artificial, desova en ríos y corrientes con fondos de grava, flujos rápidos y bien oxigenados hasta habitar de manera permanente en lagos. Como resultado, la temperatura y disponibilidad de alimento influyen el crecimiento y la maduración, haciendo que la edad de madurez varíe; aunque por lo general es de 3 a 4 años (FAO, 2009).

Estudios de la Red Nacional de Información Acuícola (RNIA, 2017) indican que la región Puno lidera en la crianza de truchas con una producción de 44 845 toneladas métricas (t) en el año 2017, seguida del departamento de Huancavelica con una producción de 3 454 t; producción debido al mejoramiento en las instalaciones (Cuadro 1).

Cuadro 1. Cosecha de truchas arco iris según departamento, 2012-2017 (t)

Departamento/año	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Amazonas	60.59	41.11	35.55	81.30	291.41	269.27
Ancash	135.77	659.00	82.10	78.56	85.70	78.82
Apurímac	38.31	50.14	59.55	75.04	97.68	125.03
Arequipa	62.33	42.82	90.67	28.79	18.81	11.95
Ayacucho	240.36	264.86	304.40	482.65	543.98	781.03
Cajamarca	328.86	328.43	175.13	75.49	139.31	162.01
Cusco	438.00	641.00	170.15	637.00	797.50	800.00
Huancavelica	1 143.91	1 222.00	1 443.95	3 386.83	3 704.05	3 454.09
Huánuco	148.00	197.70	269.10	258.99	247.00	286.00
Junín	3 412.53	2 126.97	1 614.74	1 177.55	2 262.96	2 687.62
La Libertad	9.36	9.56	49.23	122.08	120.31	124.77
Lima	128.32	197.39	219.61	253.15	371.78	423.67
Moquegua	6.23	10.66	8.44	8.44	0.00	0.00
Pasco	90.28	88.25	89.27	127.76	234.11	332.09
Puno	18 471.02	29 090.66	28 236.12	34 114.00	43 290.02	44 845.36
San Martín	0.00	0.00	7.77	9.19	0.00	0.00
Tacna	47.50	20.75	67.62	29.67	32.70	34.60

Fuente: RNIA (2017)

La sierra del Perú presenta óptimas condiciones para la crianza de truchas, es necesario el abastecimiento de agua de buena calidad, las dificultades que enfrenta su cultivo y desarrollo son la contaminación del agua, los altos costos de alimento balanceado, escasa infraestructura para el procesamiento post-cosecha y las difíciles condiciones de transporte (Fondo nacional de desarrollo pesquero, 2014). Una alternativa para la crianza en pequeña escala es mejorar los sistemas de alimentación con productos naturales de alto valor nutritivo, de bajo costo y de fácil disponibilidad para el criador, entre ellos la lombriz de tierra la cual puede ser cultivada aprovechando las excretas de los animales y deshechos de cultivos (FAO, 2018).

2.2. La hematología

El fluido sanguíneo se compone de una parte líquida (plasma) y otra sólida (células sanguíneas), ambas conforman el volumen sanguíneo que varía entre 2-4 % del peso corporal del pez, a diferencia de otros vertebrados que presentan un volumen que oscila entre 5-8 % (Brown, 1993), se encuentran similitudes entre el plasma de los peces y el de los mamíferos respecto a la respuesta inmunológica a excepción de su fracción proteica la cual es menor (Ellis, 1981). Las células sanguíneas corresponden a los glóbulos rojos encargados del transporte de oxígeno, las plaquetas para la coagulación y los glóbulos blancos para la respuesta inmune (Yasutake y Wales, 1983), los leucocitos son los que poseen más diversidad en morfología y funciones (Stoskopf, 1993). Las células sanguíneas varían en su morfología y presencia según la especie animal, es así que los peces presentan eritrocitos nucleados y la formación de estos se origina en órganos diferentes asegurando la hematopoyesis a lo largo de su vida (Ellis, 1981).

Los exámenes hematológicos realizados en piscicultura son similares a los que se aplican en los mamíferos; es posible obtener el recuento total de glóbulos rojos y el recuento total de glóbulos blancos, con la dificultad de requerir un diluyente especie-específico Natt-Herrick que permite diferenciar glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas, los subtipos de células se pueden identificar con tinciones comunes como Wright/Giemsa (Cray y Zaias, 2004).

El realizar métodos manuales para el recuento de células sanguíneas conllevan a que se presenten errores en los resultados obtenidos, siendo los más comunes: la incorrecta dilución, el llenado de la cámara, la ineficiencia al mezclar el diluyente con la sangre, la mala preparación del diluyente a utilizar, mala calibración de los equipos para realizar el recuento; por lo que es necesario tomar precauciones para disminuir o evitar los errores antes mencionados (Medway y otros, 1990).

Para obtener muestras sanguíneas es primordial utilizar un anticoagulante para la conservación de las células, el más utilizado es el ácido etilendiamino

tetracético (EDTA) que preserva la morfología y características hasta 24 horas después de extraída la sangre y no altera la tinción (Copete-Sierra, 2013), sin embargo, en peces no es recomendable ya que ocasiona daños en las células sanguíneas (Arnold y otros, 2014), éstos inconvenientes han permitido recurrir a la heparina como anticoagulante de opción ya que evita la hemólisis de glóbulos rojos y mantiene las muestras sanguíneas de manera correcta por el tiempo requerido (Salgado, 2017).

Existen métodos opcionales para el recuento celular como el frotis sanguíneo (método indirecto) para obtener el número total de la célula sanguínea que se desee conocer realizando una extensión de sangre teñida (Martínez y otros, 2011), otros métodos directos como el propuesto por Walberg (2001) quién desarrolló una fórmula basada en un modelo de estudio que consistía en saber el recuento leucocitario total en un frotis sanguíneo en aves a partir del promedio de células que son contadas en 10 campos consecutivos en aumento mayor (40x) y se multiplica por un factor 2000, obteniendo un coeficiente de variación de 36.4 % por medio del método indirecto; esta misma fórmula aplicó Hidalgo (2014) en pollos broiler obteniendo resultados dentro de los valores referenciales del recuento leucocitario para la especie. Su utilización es importante y los bajos costos de las pruebas son de gran utilidad para la prevención y diagnóstico de enfermedades (Alvis, 2006).

La hematología es una buena herramienta para estudiar y estandarizar las metodologías en la obtención de parámetros sanguíneos en peces. El recuento de leucocitos totales otorga información sobre el estatus inmunológico, pero los métodos validados representan cierta dificultad al momento de su uso en campo ya que requieren implementos de laboratorio y personal calificado para su ejecución, por ello, es menester establecer métodos de recuento indirecto de leucocitos totales en frotis sanguíneo en individuos de trucha arcoíris clínicamente sanos, como alternativa al método estándar utilizado en laboratorio (Salgado, 2017).

2.3. Características celulares sanguíneas

Los eritrocitos son las células más abundantes en la sangre, intervienen en el transporte e intercambio gaseoso; en el caso de los peces conservan su núcleo, su citoplasma presenta el material necesario para traducir el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) a proteínas que actúan de receptores de patógenos, citoquinas o proteínas relacionadas con la respuesta inmunitaria de los peces (Morera y otros, 2011). Los trombocitos son nucleados y se activan por los mismos mecanismos (Hrubec y Smith, 2010), segregan tromboplastina para mantener la hemostasia, se atribuye que los trombocitos en peces desempeñan función macrófaga y almacenan moléculas asociadas con el sistema inmunitario en sus gránulos y liberan mediadores solubles como quimioquinas, citoquinas y péptidos antimicrobianos (Esteban, 2015).

Por medio de un estudio realizado por Salazar y otros (2012) en el pez *Colossoma macropomum* para describir la morfología de los leucocitos por microscopía de luz en frotis sanguíneo se observó la presencia de seis tipos de leucocitos: plaquetas, granulocitos tipos I y II, basófilos, linfocitos y monocitos y plasmocitos o células inmaduras. De la serie blanca, las plaquetas fueron las más abundantes (48 %), seguidas de los linfocitos (19 %) y de los granulocitos tipo I (18 %). Los granulocitos tipo I son células esféricas (8-10 μm), con núcleo excéntrico y citoplasma con finas granulaciones distribuidas homogéneamente, los granulocitos tipo II, son células grandes (10-12 μm) con núcleo compacto, excéntrico. Los monocitos y basófilos representaron del 0-2 % del total de células y se observaron células inmaduras o plasmocitos en una proporción de 2 %. Estos resultados fueron descritos para otros teleósteos y los granulocitos tipo I son leucocitos primarios en inmunidad.

Los linfocitos constituyen en los peces el 40 % a 77 % de los leucocitos totales (Wittwer, 2012), la mayoría son producidos en el pronefro y en el timo (Olabuenaga, 2000), actúan en la respuesta inmune (Hrubec y Smith, 2010); los

linfocitos T proporcionan la inmunidad mediada por células y los linfocitos B la respuesta inmune humoral con producción de anticuerpos (Wittwer, 2012). En peces la mediada por células es innata desde el nacimiento son específicas al reconocer anticuerpos varía entre los dos a diez meses después de la eclosión (Olabuena, 2000). Los heterófilos son similares a los neutrófilos de los mamíferos y representan entre 2 a 25 % del total de leucocitos en peces (Wittwer, 2012), participan en la respuesta inflamatoria, contienen gránulos lisosomales y son capaces de provocar lisis extracelular (Olabuena, 2000), se les atribuye actividad fagocitaria (Hrubec y Smith, 2010). Los monocitos constituyen el entre el 0 a 3 % del total de leucocitos en peces, de corta vida media en sangre, migran a los tejidos y se establecen como macrófagos (Wittwer, 2012). Los macrófagos de actividad fagocitaria en peces son abundantes en bazo y tejido renal, se pueden encontrar en mucosas (Olabuena, 2000).

Los eosinófilos participan en la destrucción de parásitos internos y modulación de reacciones alérgicas e inflamatorias (Hrubec y Smith, 2010). Los basófilos representan entre 0 a 1 % del total de leucocitos (Wittwer, 2012), son raros en peces atribuible a fallas en la conservación de su morfología por los fijadores y tinciones, capacitados para digerir microorganismos (Hrubec y Smith, 2010).

En dos muestreos separados por dos semanas se obtuvo muestras de sangre en tubos con heparina litio de 54 ejemplares de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), los recuentos leucocitarios se realizaron 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 cámara fue 19 499 leucocitos/ μ L con coeficiente de variación (CV) de 47.88 % y en frotis 43 552 leucocitos/ μ L con coeficiente de variación de 32.18 %. 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 (≥ 0.80) lo que sugiere la posibilidad de ser utilizada en estimaciones de leucocitos. Basado en los resultados 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, constituyéndose en el primer modelo matemático 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 campo (Salgado, 2017).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de investigación

La recolección de datos se realizó en el sector César Vallejo, en el distrito de Agallpampa, en la provincia de Otuzco, en el departamento de La Libertad, a una altitud de 3 300 msnm y la fase de análisis de muestras se llevó a cabo en el Laboratorio de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Privada Antenor Orrego del departamento de La Libertad.

3.2. Animales de estudio

Se utilizaron un total de 90 truchas arco iris de ambos sexos de la misma edad, aparentemente sanas escogidas al azar.

3.3. Manejo

Los alevinos de truchas arco iris procedente del criadero de Motil se adaptaron en tanques de polipropileno de 1000 L cada uno (25 peces/tanque) en donde fueron distribuidos, presentando como peso promedio inicial de 5 g. El suministro de agua fue a través de tubos PVC, captada de una fuente natural por un sistema de circulación abierta, con entrada y salida de agua, los peces fueron alimentados con una ración diaria en relación al 1 % de su peso vivo, 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©.

3.4. Toma de muestra

A los seis meses de vida, se seleccionaron seis especímenes de cada tanque que cumplieran con el peso promedio de 60 g, completando un total de 90 truchas arco iris, de las cuales se extrajo sangre individualmente en dos ocasiones, separadas por un período de tres días. En cada ocasión de muestreo se analizaron 45 individuos; finalizado la extracción de sangre, cada pez fue sacrificado.

3.5. Variable a evaluar

Caracterización leucocitaria: identificación celular y conteo leucocitario.

3.6. Metodología

3.6.1. Método de extracción de sangre

De cada individuo se extrajo 1 mL de sangre por medio de la técnica de obtención directa vía vena caudal y se depositó en tubos de 4 mL con anticoagulante heparina litio, homogenizándose por 30 segundos, y se mantuvo en refrigeración hasta su procesamiento en el Laboratorio de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Privada Antenor Orrego. La elección del anticoagulante fue debido a la capacidad para mantener la integridad de las células durante 6 a 10 horas (Gálvez y otros, 2009).

3.6.2. Frotis sanguíneo

Se necesitó una gota de sangre de cada muestra para realizar los frotis sanguíneos, donde luego se empleó la tinción Giemsa para poder diferenciar las células sanguíneas.

3.6.3. Recuento diferencial de células en frotis sanguíneo

Realizada la tinción y secado de cada frotis sanguíneo, se cubrieron individualmente con una laminilla cubreobjetos con un microscopio óptico en objetivos de 40x e inmersión (100x), para tal propósito se identificó la zona de monocapa celular ubicada en el último tercio del frotis cercana al borde siguiendo un orden de con la finalidad de no superponer áreas. Cada recuento se multiplicó por una constante de 2 000 y se obtuvo el valor absoluto de leucocitos totales (células/ μ L). Ambos valores resultantes corresponden a recuentos celulares totales obtenidos desde una misma muestra. El valor final fue el promedio de ambos (Walberg, 2001).

3.7. Análisis estadístico

Los datos obtenidos del recuento leucocitario fueron procesados utilizando el programa Microsoft Excel 2010 para obtener la estadística descriptiva que permitió recopilar, organizar y analizar los valores necesarios para deducir las características de la población.

IV. RESULTADOS

En el cuadro 2 se presentan los valores de la estadística descriptiva, donde se observa que al primer muestreo el número de leucocitos promedio fue 38 738.99 células/uL, una desviación estándar de 12 396.02 y un coeficiente de variación de 32 %; mientras que en el segundo muestreo el número de leucocitos promedio fue 46 721.11 células/uL, una desviación estándar de 16 382.33 y un coeficiente de variación de 35.06 %.

Cuadro 2. Valores promedios de leucocitos totales de trucha arco iris, evaluado a 32 semanas de edad

Evaluación	n	Promedio (Leucocitos/uL)	DS	C.V. (%)
1ra	45	38738.89	12396.02	32.00
2da	45	46721.11	16382.33	35.06

En las siguientes figuras se muestran las células sanguíneas que se reconocieron y se diferenciaron en los frotis sanguíneos; para ello se utilizó un microscopio óptico en objetivo de 100x para identificar los leucocitos según su morfología correspondientes a la serie blanca (Figuras del 1 al 7).

En la figura 1 encontramos una monocapa de eritrocitos con presencia de un monocito y un monoblasto.

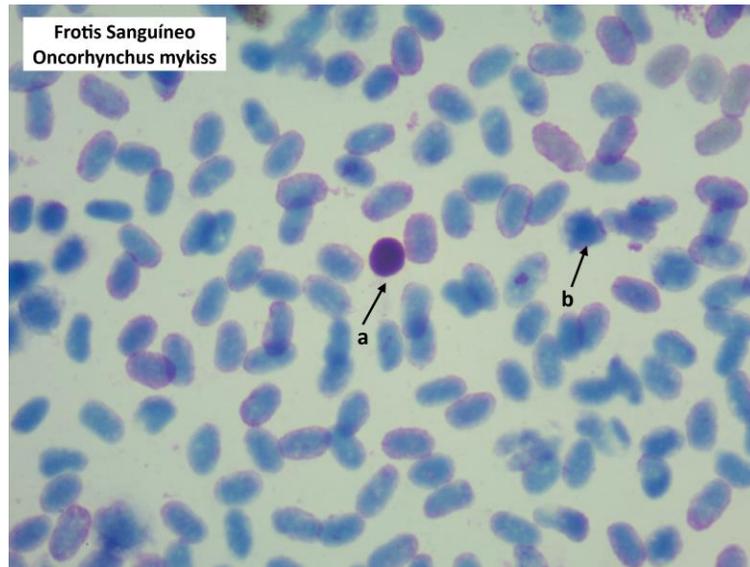


Figura 1. Micrografía de frotis sanguíneo para recuento indirecto de leucocitos. Tinción Giemsa 1000x. Letra "a" indica un monocito maduro. Letra "b" indica un monoblasto.

En la figura 2 encontramos un linfocito activado presente en la extensión sanguínea.

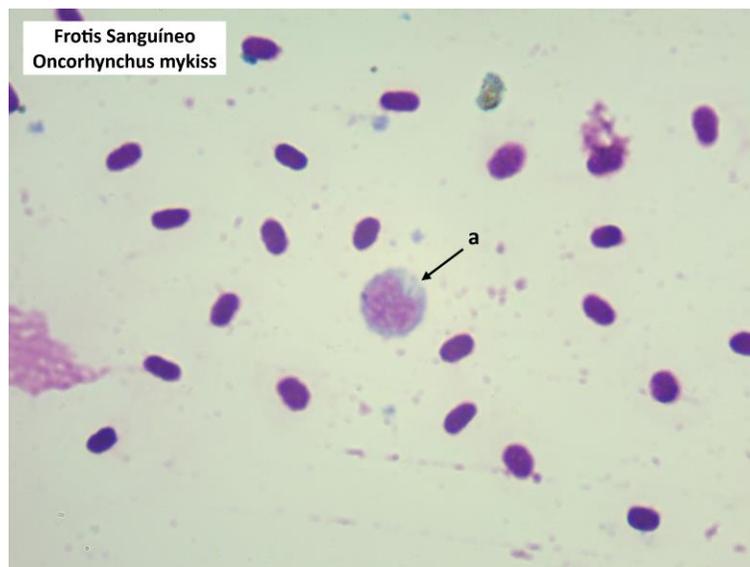


Figura 2. Micrografía de frotis sanguíneo para recuento indirecto de leucocitos. Tinción Giemsa 1000x. Letra "a" indica un linfocito activado.

En la figura 3 encontramos linfocitos grandes activados, monocitos y un neutrófilo.

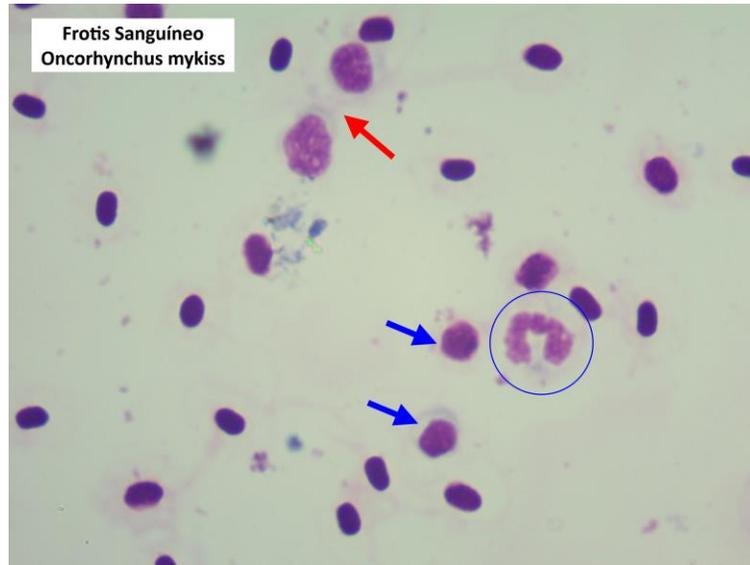


Figura 3. Micrografía de frotis sanguíneo para recuento indirecto de leucocitos. Tinción Giemsa 1000x. Se observan linfocitos grandes activados (flechas rojas), monocitos maduros (flechas azules) y un neutrófilo (círculo azul).

En la figura 4 encontramos eritrocitos maduros, eritrocitos inmaduros y linfocitos.

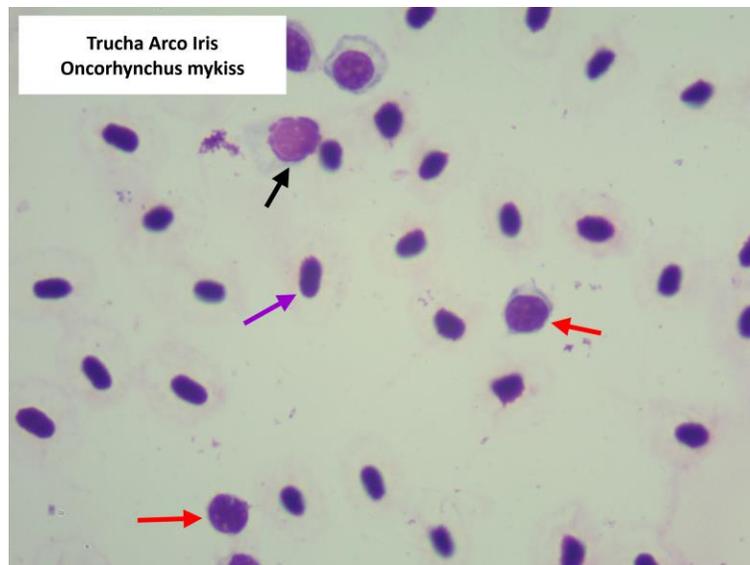


Figura 4. Micrografía de frotis sanguíneo. Recuento indirecto. Tinción Giemsa 1000x. La flecha negra señala eritrocitos inmaduros o policromatocitos. La flecha morada señala eritrocitos maduros. Las flechas rojas señalan linfocitos.

En la figura 5 encontramos un grupo de plaquetas en actividad, la presencia de linfocitos maduros y eritrocitos.

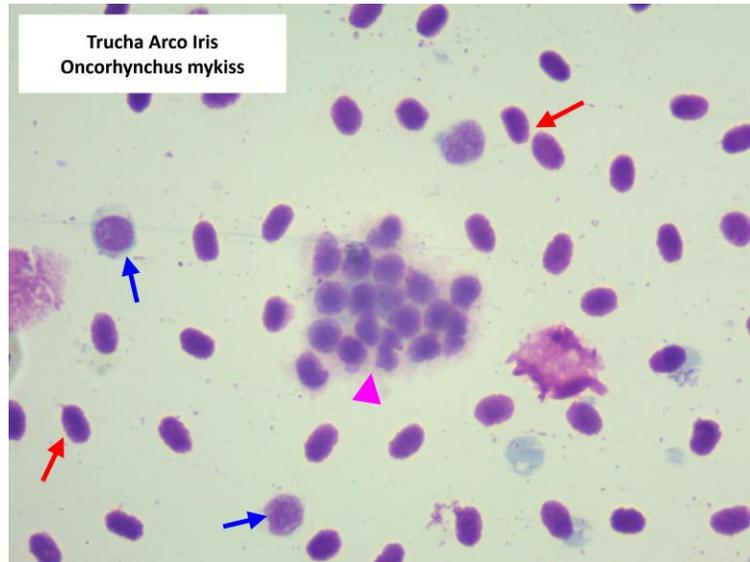


Figura 5. Micrografía de frotis sanguíneo para recuento indirecto de leucocitos. Tinción Giemsa 1000x. Las flechas rojas señalan eritrocitos. Las flechas azules señalan linfocitos maduros. La punta de flecha señala un grupo de plaquetas.

En la figura 6 encontramos la morfología de los granulocitos tipo I.

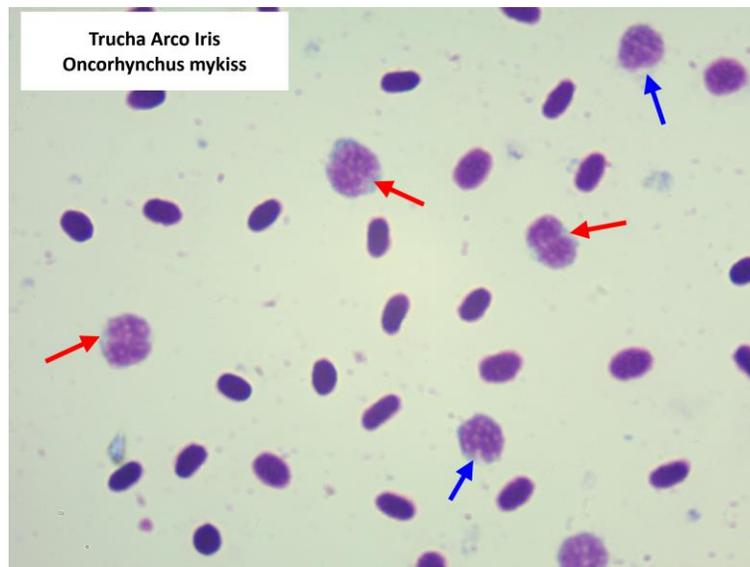


Figura 6. Micrografía de frotis sanguíneo. Recuento indirecto. Tinción Giemsa 1000x. Las flechas rojas señalan los mielocitos. Las flechas azules señalan los granulocitos maduros.

V. DISCUSIÓN

En la presente investigación se ha buscado caracterizar por medio de extensiones sanguíneas la serie leucocitaria de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), mostrando que esta práctica sí sirve para el reconocimiento celular en esta especie, logrando identificar los leucocitos por medio de frotis sanguíneos según su morfología correspondiente a la serie blanca. Como señaló Martínez y otros (2011), sí es posible a través del método indirecto obtener estimaciones del número total de leucocitos al igual que su reconocimiento.

Por cada individuo se realizaron tres frotis sanguíneos, donde se eligieron dos de ellos por la calidad de la tinción; siguiendo el protocolo que Walberg (2001) describió para realizar el método indirecto, fueron identificadas células de la serie leucocitaria.

Realizar el recuento leucocitario de ambos muestreos fue dificultoso dado que al momento de efectuar la toma de muestra sanguínea de cada individuo se presentaron factores contaminantes que pueden haber perjudicado la calidad de la sangre obtenida; como lo indican Hrubec y Smith (2010), la presencia de errores en los factores como la toma de muestra, la refrigeración para mantener la integridad de las células sanguíneas, la elaboración de los frotis sanguíneos pueden influenciar en los resultados, impidiendo confiar en ellos para dar un diagnóstico en piscicultura.

Para reducir el error que se pueda cometer en la extracción de sangre a los individuos y aumentar la confiabilidad de los resultados obtenidos, Vap y otros (2012) detallan que es necesario seguir un protocolo determinado para la toma de muestra como para la realización de las extensiones sanguíneas, al igual que la debida

preparación y práctica que tenga la persona encargada; como también, es importante elegir el tipo de anticoagulante que debe usarse en esta especie, en este caso se utilizó heparina litio ya que mantiene la integridad de la muestra por el lapso de tiempo necesario de 6 a 10 horas (Gálvez y otros, 2009).

Con los datos obtenidos de la estadística descriptiva, el valor de la media del primer muestreo es de 38 738.89 leucocitos/uL y el valor de la media del segundo muestreo es de 46 721.11 leucocitos/uL; se pudo determinar que la media del segundo muestreo es mayor que la del primer muestreo. La comparación de los resultados del primer muestreo contra los del segundo muestreo denotan una diferencia significativa, considerando que hubo un intervalo de tres días entre las tomas de muestras, no brindando el tiempo necesario para que los individuos se recuperaran tanto de la manipulación como de la extracción de sangre, logrando ocasionar estrés en la población. Como lo detallado por Maule y Scherck (1990), los cuales explicaron que al momento de la toma de muestra, éste produce un efecto natural de estrés de la cual su magnitud dependerá de distintos factores como la manipulación del espécimen hasta el método para la obtención de la sangre, produciendo que los niveles de cortisol se eleven y surjan efecto sobre la distribución de las células en la circulación.

Burka y otros (1997) recomendaron utilizar anestésicos como un manejo previo a la manipulación dado que en piscicultura es uno de los factores que influye a que el animal se estrese más ya sea dentro o fuera del agua. Según Sáez y otros (2018), las variaciones que se observen en los valores hematológicos en piscicultura pueden dar a conocer su estado de salud, siendo una herramienta vital para la determinación de alteraciones en el hábitat donde se desarrollan o cuadros de estrés en la población, el cual produciría un aumento en los valores leucocitarios.

La hematología en piscicultura es un tema que comúnmente no es practicado debido a que los valores hematológicos varían según la clasificación que tengan los peces y la zona donde se produzcan y reproduzcan; sin embargo, esto no significa que no sea necesario realizarlo, es una opción viable para esta especie el recuento leucocitario y la identificación de células sanguíneas (Hrubec y Smith, 2010). Para el acuicultor no es importante hacer un estudio hematológico ya que se considera tedioso el manejo para realizar esta práctica, donde compromete el bienestar de su población y deriva costos extras el contratar terceras personas que efectúen esa labor.

VI. CONCLUSIONES

Las extensiones sanguíneas nos permiten la identificación celular y realizar el recuento de leucocitos total en truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

La implementación de extensiones sanguíneas en el campo sí puede servir como un apoyo veterinario para determinar si algún factor altera el estado de salud.

Se observó que el factor estrés altera la distribución de células blancas en sangre.

VII. RECOMENDACIONES

Incrementar el número de muestras para tener mayor certeza y la posibilidad de que sea más representativa la población.

Mejorar las medidas sanitarias al momento de realizar la extracción sanguínea y el manejo de las muestras hematológicas.

Realizar estudios para estandarizar los valores hematológicos normales de la trucha arco iris dependiendo de la vía de extracción sanguínea, con la finalidad de tener valores de referenciales que den conocimiento sobre la condición que presente.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Alvis, G. (2006). La Hematología como herramienta indicadora de la salud en los peces. Revista electrónica de ingeniería en producción acuícola. Universidad de Nariño. Nariño, Colombia. 4 p.

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. <https://doi.org/10.1111/vcp.12214>

Arregui, L. (2013). El cultivo de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Fundación observatorio español de acuicultura Madrid. 103 p.

Black, M. (2000). Collection of Body Fluid. In: Ostrander, G. The Laboratory Fish. Academic press. Londres, Reino Unido. 498-501.

Brown, L. (1993). Aquaculture for veterinarians. Londres, Reino Unido. Pergamon Press. 447 p.

Burka, J., Hammell, K., Horsberg, E., Johnsons, G., Rainnie, D., Speare, D. (1997). Drugs in salmonid aquaculture - A review. J Vet Pharmacol Therap. 20(5):333-349. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2885.1997.00094.x>

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.

Ellis, A. (1981). Stress and the modulation of defence mechanisms in fish. In: Pickering, A.D. (Ed.). Stress & Fish, Acad Press, London. 147-169.

Esteban, M., Cuesta, A., Chaves-Pozo, E., Meseguer, J. (2015). Phagocytosis in teleosts. Implications of the new cells involved. 4:907-922. <https://doi.org/10.3390/biology4040907>

FAO. (2009). *Oncorhynchus mykiss*. Programa de información de especies acuáticas. Roma. 12 p.

FAO. (2018). El estado mundial de la pesca y la acuicultura (2018). Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma. 233 p.

Fondo Nacional de desarrollo Pesquero. (2014). Manual de crianza de truchas en ambientes convencionales. Lima-Perú. 57p.

Gálvez, C., Ramírez, G., Henry, J. (2009). The Clinic Laboratory in Hematology of Exotic Birds. Biosalud. 8:178-188. Recuperado 06 de junio de 2020, de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95502009000100020&lng=en&tlng=es.

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. 6ta ed. Wiley-Blackwell. Iowa, USA. 994-1003. Recuperado 24 de junio de 2020, de <https://www.noor-book.com/en/ebook-Schalm%E2%80%99s-Veterinary-Hematology-6th-ed--pdf>.

Martínez, A., Lavín, S., Cuenca, R. (2011). Hematology and blood cytology in reptiles. Clin. Vet. Peq. Anim. 31(3):131-141. Recuperado 24 de junio de 2020, de https://ddd.uab.cat/pub/clivetpeqani/clivetpeqani_a2011v31n3/clivetpeqaniv31n3p131.pdf.

Maule, A.; Schreck, C. (1990). Changes in Numbers of Leukocytes in Immune Organs of Juvenile Coho Salmo after Acute Stress or Cortisol Treatment. Journal of

Aquatic Animal Health. 2:298-304. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(1990\)002<0298:CINOLI>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(1990)002<0298:CINOLI>2.3.CO;2).

Medway, W., Prier, J., Wilkinson, J. (1990). Patología clínica veterinaria. In: Hematología. 1ra ed. Iztapalapa, México. 228-234.

Mendoza, D. (2010). Elaboración del estudio de mercado en la Trucha en Arequipa, Cusco, Lima, Puno y Huancayo. Estudio de determinación y especificaciones de la Trucha. [PRODUCE] Ministerio de la Producción. Perú. Recuperado 24 de junio de 2020, de <http://www2.produce.gob.pe/RepositorioAPS/3/jer/DGA-PUBLICACIONES/estudio-de-mercado-trucha.pdf>.

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. Recuperado 24 de junio de 2020, de <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0026998&type=printable>.

Olabuenaga, S. (2000). Sistema inmune en peces. Gayana. 64(2):205-215.

Red Nacional de Información Acuícola. (2017). Perú: cosecha de recursos hidrobiológicos de la actividad de acuicultura según departamento y especie, 2006-2017. Lima, Perú. 2 p.

Red Nacional de Información Acuícola. (2018). Producción nacional de trucha creció 678 % en 10 años. Recuperado 24 de junio de 2020, de <https://rnia.produce.gob.pe/produccion-nacional-de-trucha-crecio-678-en-10-anos/>.

Rozas, M., Müller, A., Bittencourt, P. (2015). Manual de patología clínica de peces salmónidos: Determinación de parámetros hematológicos, inmunológicos y mecanismos involucrados en las respuestas del hospedero a infecciones prevalentes y co-infecciones". Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.

Recuperado 24 de junio del 2020, de <https://www.pathovet.cl/wp-content/uploads/2018/07/MANUAL-DE-PATOLOGI%CC%81A-CLI%CC%81NICA.pdf>.

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. 7-10.

Sáez, G., Chero, J., Cruces, C., Minaya, D., Rodríguez, C., Suyo, B., Romero, S., Guabloche, A., Tuesta, E., Alvarino, L., Iannacone, J. (2018). Parámetros hematológicos y de bioquímica sanguínea en peces del Callao. Revista de investigaciones veterinarias del Perú. 29(4):1161-1177. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i4.15204>.

Salazar-Lugo, R., Romero, Z., Centeno, L. (2012). Caracterización morfológica y citoquímica de leucocitos del pez dulceacuícola *Colossoma macropomum* (CHARACIFORMES: CHARACIDAE). Universidad de Oriente, Venezuela. 24(1): 5-10. Recuperado 24 de junio de 2020, de <https://www.redalyc.org/pdf/4277/427739447003.pdf>.

Salgado, P. (2017). Cuenta de leucocitos en frotis sanguíneo como alternativa de campo al método del hemocitómetro en especímenes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) clínicamente sanos (tesis de pregrado). Universidad de Chile. Santiago, Chile. 52 p.

Serrano, E., Leguía, G., Quispe, M., Casas, G. (2013). Valores hematológicos del paiche *Arapaima gigas* de la Amazonía peruana. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. Lima, Perú. 24(2): 248-251. Recuperado 24 de junio de 2020, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172013000200016.

Stoskopf, M. (1993). Immunology. In: W.B. Saunders Company (Ed.). Fish Medicine. Harcourt Brace Jovanovich Inc., Philadelphia, USA.

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. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2012.00413.x>.

Walberg, J. (2001). White blood cell counting techniques in birds. *Semin. Avian. Exot. Pet. Med.* 10(2):72-76. <https://doi.org/10.1053/saep.2001.22051>

Wittwer, F. (2012). Generalidades de Hematología. In: *Hematología de Salmonídeos*. Valdivia, Chile. 1-3. Recuperado 24 de junio de 2020, de https://www.researchgate.net/profile/Mirela_Noro/publication/259694227_Hematologia_de_Salmonideos/links/02e7e52d66199664fb000000/Hematologia-de-Salmonideos.pdf.

Yasutake, W. T., & Wales, J. H. (1983). *Microscopic anatomy of salmonids: an atlas* (Vol. 150). United States Department of the Interior, Fish and Wildlife Service.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Resultado del recuento total de leucocitos del primer muestreo.

Recuentos totales de leucocitos/ μ L del primer muestreo

Muestra	Leucocitos totales/ μ L.	Muestra	Leucocitos totales/ μ L.
1	21500	24	31800
2	31800	25	33000
3	36800	26	37900
4	30800	27	55600
5	30100	28	71550
6	39950	29	42000
7	25500	30	28650
8	18350	31	55850
9	29850	32	60500
10	45800	33	38300
11	31950	34	37900
12	31700	35	40750
13	15950	36	39950
14	61900	37	42500
15	39500	38	43450
16	29550	39	39850
17	58500	40	26900
18	27900	41	19650
19	34900	42	40950
20	38500	43	40200
21	55600	44	42650
22	49650	45	58650
23	28650		

Anexo 2. Resultado del recuento total de leucocitos del segundo muestreo.

Recuentos totales de leucocitos/ μ L del segundo muestreo

Muestra	Leucocitos totales/ μ L.	Muestra	Leucocitos totales/ μ L.
46	29600	69	78050
47	15350	70	33700
48	61750	71	54800
49	42000	72	71500
50	71550	73	49350
51	63950	74	54600
52	36100	75	39250
53	43800	76	44200
54	36950	77	24900
55	41650	78	30600
56	59850	79	42450
57	83050	80	38900
58	56800	81	39650
59	31850	82	33650
60	39800	83	45100
61	25800	84	33650
62	39850	85	75600
63	34800	86	29850
64	31250	87	79550
65	40150	88	55300
66	39650	89	67650
67	65950	90	49050
68	39600		

Anexo 3. Resultados de la estadística descriptiva de los datos del primer muestreo.

Estadística descriptiva del recuento total de leucocitos/ μ L del primer muestreo.

<i>Leucocitos totales/μL.</i>	
Media	38738.89
Desviación estándar	12396.02
Coefficiente de variación (%)	32.00

Anexo 4. Resultados de la estadística descriptiva de los datos del segundo muestreo.

Estadística descriptiva del recuento total de leucocitos/ μ L del segundo muestreo.

<i>Leucocitos totales/μL.</i>	
Media	46721.11
Desviación estándar	16382.33
Coefficiente de variación (%)	35.06

Anexo 5. Extracción de sangre vía punción en vena caudal.

Extracción de sangre vía punción en vena caudal

1. Materiales:

- Jeringa de 3mL.
- Aguja de 23 G x 1 1/2”.
- Tubos de 4 mL con Heparina Litio.

2. Procedimiento:

- Para la sujeción en peces, se utilizaron paños o toallas húmedas que contrarrestaran movimientos involuntarios que perjudicaran al momento de la extracción (Figura 9).
- Se posicionó al espécimen decúbito dorsal y se reconoció el área donde se realizó la punción, entre la aleta anal y la aleta caudal en la línea media ventral cerca de la base del pedúnculo caudal.
- Se insertó la aguja de 23G con el bisel hacia arriba, tomando el ángulo de 4 a 50 grados en relación a la línea medial.
- Luego de encontrar los cuerpos vertebrales, se retiró lentamente la aguja mientras que la presión negativa se aplica a la jeringa. Cuando los vasos se introdujeron, la sangre ingresó en la jeringa llenándose 1 mL a más (Figura 10).
- Terminada la recolección, la sangre fue depositada en el tubo con Heparina Litio, fue homogenizado con movimientos leves e identificando cada uno con el número de espécimen correspondiente (Figura 11).

Anexo 5.1. Sujeción del espécimen con paño húmedo.



Anexo 5.2. Extracción de muestra sanguínea.

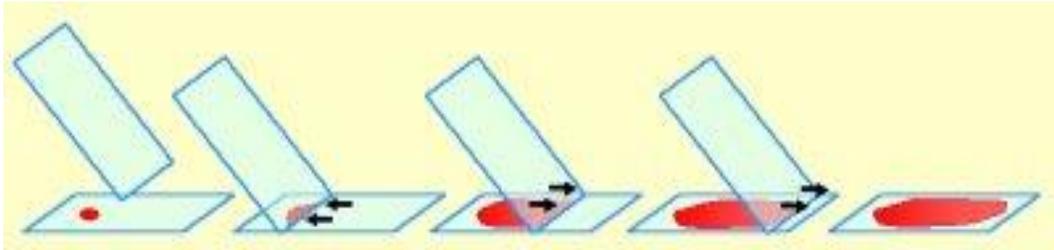


Anexo 6. Realización del frotis sanguíneo.

Frotis sanguíneo

1. Tomar un portaobjeto y limpiarlo (sujetarlo evitando ensuciar la parte superior).
2. Colocar en un extremo una gota de sangre directamente de la muestra recolectada con un tubo de hematocrito.
3. Realizar la extensión con otro portaobjeto, posicionándolo en un ángulo de 30°, corriéndolo hasta el otro extremo formando una película del mismo grosor en toda la lámina.
4. Secar al aire.

Anexo 6.1. Realización de frotis sanguíneo.



Anexo 7. Elaboración de la tinción Giemsa utilizada en las muestras.

Tinción Giemsa

1. Dilución del colorante Giemsa madre en agua destilada (Proporción 1:9).
2. Teñir la lámina con el colorante diluido (verter sobre la muestra).
3. Dejar reposar por 20 minutos.
4. Lavara con agua destilada.
5. Secar al aire.
6. Cubrir con Cover Glass (aplicar una gota de bálsamo de Canadá).
7. Observar el resultado.

Anexo 8. Recorrido de la lámina para la lectura microscópica.

Lectura microscópica

1. Se deben observar puntos como la calidad con la que fue realizada el frotis sanguíneo, el anticoagulante que fue utilizado y la tinción usada, debido a que de eso va a depender la morfología de las células que se observen.
2. Reconocer las partes del frotis sanguíneo: Cuerpo, monocapa y borde; para ello, se debe recorrer toda la lámina e identificar cada zona.
3. La zona ideal para el reconocimiento de células sanguíneas es la monocapa, es en esa parte donde encontramos las células bien extendidas sin presentar deformaciones.
4. La lámina es colocada en el microscopio, se aplica una gota de aceite de inmersión, se enfoca a un aumento de 1000x y se empieza el recorrido, el desplazamiento es de forma zigzag desde la parte superior de la monocapa hasta la parte inferior, revisando la calidad de la coloración y reconociendo las células presentes.

Anexo 8.1. Recorrido de la lectura microscópica.

