

EVALUACIÓN DEL ANALIZADOR
AUTOMÁTICO SYSMEX XN-1000V PARA
EL ANÁLISIS HEMATOLÓGICO DE
MUESTRAS DE *ONCORHYNCHUS MYKISS*
(TRUCHA ARCOÍRIS)

PERFORMANCE OF AN AUTOMATIC
ANALYZER SYSMEX XN-1000V ON
HEMATOLOGICAL SAMPLES FROM
ONCORHYNCHUS MYKISS
(RAINBOW TROUT)

Máster de Biología Marina: Biodiversidad y
Conservación

MERITXELL UROZ MOYA

Junio del 2022

AUTORIZACIÓN DEL TUTOR/ES

La **Dra. Cintia Hernández Sánchez**, Personal Docente e Investigador en Categoría Contratado Doctor (Tipo 1) en el Área de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de La Laguna y la **Dra. Mariana Teles Pereira** Investigadora Ramón y Cajal y Docente en la Universidad Autónoma de Barcelona, como Tutora Académica y Tutora Externa, respectivamente,

DECLARAN:

Que la memoria presentada por **Dña. Meritxell Uroz Moya** titulada “Evaluación del analizador automático Sysmex XN-1000V para el análisis hematológico de muestras de *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoíris)”, ha sido realizada bajo su dirección y consideran que reúne todas las condiciones de calidad y rigor científico requeridas para optar a su presentación como Trabajo de Fin de Máster, en el Máster Oficial de Postgrado de Biología Marina: Biodiversidad y Conservación de la Universidad de La Laguna, curso 2021-2022.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firman el presente informe favorable en San Cristóbal de La Laguna a 29 de junio de 2022.

Firmado por HERNANDEZ SANCHEZ
CINTIA - 78565922S el día
30/06/2022 con un certificado
emitido por AC FNMT Usuarios

Fdo. Dra. Cintia Hernández Sánchez

MARIANA
TELES
PEREIRA -
DNI
49830666Q

Firmado digitalmente por
MARIANA TELES PEREIRA -
DNI 49830666Q
Nombre de
reconocimiento (DN):
c=ES, sn=TELES PEREIRA,
givenName=MARIANA,
serialNumber=IDCES-4983
0666Q, cn=MARIANA
TELES PEREIRA - DNI
49830666Q
Fecha: 2022.06.29
22:19:45 +02'00'

Fdo. Dra. Mariana Teles Pereira

AGRADECIMIENTOS

Mi pasión por la biología viene de muy pequeña, incluso antes de saber con exactitud lo que significaba ser bióloga, sabía que quería serlo. El estudio de las especies marinas, los ecosistemas y su conservación me llamó tanto la atención que poco a poco me fui adentrando en este apasionado mundo del que tanto me queda por aprender.

Ir a Tenerife a estudiar el máster de biología marina ha sido una de las mejores decisiones que he tomado porque me ha ayudado a reafirmar mi pasión por la biodiversidad marina en un entorno idílico para su estudio. Pero no todo fue fácil, y no habría sido posible sin el apoyo incondicional de mi familia, quienes siempre han confiado en mí y me han apoyado en cada una de mis decisiones. Tampoco lo habría sido sin el apoyo de mi pareja, quien fue el primero en animarme a estudiar el máster y quien estuvo a mi lado en las buenas y no tan buenas de las mil y una aventuras en la isla. Agradezco también a mis amigas, por apoyarme siempre y darme ánimo cuando más lo he necesitado y a la gente bonita que he tenido el placer de conocer en la isla, mi segundo hogar.

Con la llegada del Covid no nos quedó más remedio que regresar a Barcelona. Ahí empezó una larga batalla detrás de la pantalla en busca de grupos de investigación con los que poder realizar las prácticas y el proyecto final de máster, ya que, aunque se estaba volviendo poco a poco a la normalidad, el teletrabajo y los grupos reducidos no facilitaban el desarrollo de nuevas líneas de investigación. Entonces apareció Mariana para darme la oportunidad de continuar con mi formación académica en la Universidad Autónoma de Barcelona y por ello le estaré siempre muy agradecida.

Agradezco a Mariana e Irene, cotutoras de este trabajo final de máster, por la oportunidad, la confianza depositada en mí y la ayuda brindada para que este trabajo haya sido posible. A Josep, por acogerme en el laboratorio de hematología de la facultad de veterinaria y enseñarme todo lo que necesitaba saber sobre hematología y la validación del analizador hematológico. A los compañeros del laboratorio de hematología (Prof. Rafi, Montse, Ana, Bea, Oriol y los chicos de prácticas) por el apoyo durante el proceso y por hacerme sentir una más; en especial a Montse, quien me enseñó las técnicas de análisis hematológico y me ayudó con el recuento celular de las muestras de sangre. También, agradezco la colaboración de Ali y el equipo del IBB por ayudarme con la obtención de muestras de sangre.

A Cintia por la tutorización y seguimiento del trabajo y a José Antonio por ayudarme a resolver las dudas académicas que surgieron durante el proceso.

A todos ellos, gracias por poner vuestro granito de arena.

ÍNDICE GENERAL

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	OBJETIVOS.....	6
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	7
3.1.	PECES DEL ESTUDIO	7
3.2.	OBTENCIÓN DE MUESTRAS	8
3.3.	MÉTODO MANUAL	8
3.3.1.	VALOR DE HEMATOCRITO.....	8
3.3.2.	PROTEÍNAS PLASMÁTICAS	9
3.3.3.	RECuento DE LEUCOCITOS Y ERITROCITOS	10
3.3.4.	ESTIMACIÓN Y DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS.....	10
3.3.5.	ESTIMACIÓN DE TROMBOCITOS	11
3.4.	MÉTODO AUTOMÁTICO – SYSMEX XN-1000V	13
3.4.1.	LINEALIDAD	14
3.4.2.	ARRASTRE (“CARRY-OVER”).....	15
3.4.3.	PRECISIÓN	15
3.4.4.	ESTABILIDAD	15
3.4.5.	COMPARACIÓN DE MÉTODOS.....	16
3.5.	ESTUDIO DEL TIPO DE ANTICOAGULANTE.....	16
3.6.	ESTUDIO DEL TIPO DE ANESTESIA.....	17
3.7.	ESTUDIO DEL EFECTO DE LESIONES CUTÁNEAS SOBRE EL HEMOGRAMA	17
3.8.	VALORES DE REFERENCIA	17
3.9.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	18
4.	RESULTADOS.....	19
4.1.	MÉTODO AUTOMÁTICO – SYSMEX XN-1000V	19
4.1.1.	LINEALIDAD	19
4.1.2.	ARRASTRE (“CARRY-OVER”).....	20
4.1.3.	PRECISIÓN	20
4.1.4.	ESTABILIDAD	21
4.1.5.	COMPARACIÓN DE MÉTODOS.....	26
4.2.	ESTUDIO DEL TIPO DE ANTICOAGULANTE.....	29
4.3.	ESTUDIO DEL TIPO DE ANESTESIA	31
4.4.	ESTUDIO DEL EFECTO DE LESIONES CUTÁNEAS SOBRE EL HEMOGRAMA	32

4.5.	VALORES DE REFERENCIA	34
5.	DISCUSIÓN.....	36
5.1.	ESTABILIDAD DE LAS MUESTRAS	37
5.2.	COMPARACIÓN DE MÉTODOS.....	38
5.3.	ESTUDIO DEL TIPO DE ANTICOAGULANTE.....	38
5.4.	ESTUDIO DEL TIPO DE ANESTESIA	39
5.5.	UTILIDAD DEL HEMOGRAMA PARA DETECTAR PATOLOGÍAS Y ENFERMEDADES INFLAMATORIAS	40
5.6.	VALORES DE REFERENCIA	41
6.	CONCLUSIONES	42
7.	CONCLUSIONS.....	43
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Métodos y canales utilizados para los parámetros hematológicos analizados.....	13
Tabla 2.	Estudio de la precisión del Sysmex XN-1000V para muestras de sangre de <i>Oncorhynchus mykiss</i> con recuentos celulares normales y altos.	21
Tabla 3.	Estudio de la precisión en el método manual para el recuento celular de muestras de sangre de <i>O. mykiss</i> por parte de dos observadores.	21
Tabla 4.	Comparación de métodos para el recuento celular entre el Sysmex XN-1000V y el método manual.	26
Tabla 5.	Valores de referencia de los parámetros hematológicos del estudio de <i>O. mykiss</i>	34
Tabla 6.	Rangos de los valores descritos para los parámetros hematológicos de <i>O. mykiss</i> publicados en otros estudios.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de los diferentes tipos de células sanguíneas en peces. Imagen extraída de Claver y Quaglia (2009).....	2
Figura 2A. Tubos capilares de microhematocrito en la centrífuga específica para microhematocritos Centromix II BL. Figura 2B. Tubos capilares de microhematocrito con el empaquetamiento de eritrocitos, leucocitos y plasma después de ser centrifugados.	9
Figura 3A. Hemocitómetro o cámara de Neubauer. Figura 3B. Cuadrícula de la cámara de Neubauer. Imagen obtenida de: https://blogceta.zaragoza.unam.mx/manualbct2/anexo-2-camara-de-neubauer/	10
Figura 4. Diferenciación entre eritrocitos (flecha azul) y los leucocitos (flecha negra) en una muestra de frotis sanguíneo observada en el microscopio óptico con el objetivo de 100 X. Los diferentes tipos de leucocitos que se observan son: linfocitos (izquierda), heterófilos (centrales) y monocitos (derecha).	11
Figura 5. Observación de trombocitos (flecha negra) en una muestra de frotis sanguíneo, observada en el microscopio óptico con el aumento de 100 X. En la preparación también se observan eritrocitos (flecha azul) y linfocitos (flecha roja).	12
Figura 6A. Citograma modelo del canal de aves del Sysmex XN-1000V de las diferentes poblaciones celulares: eritrocitos (azul), leucocitos (rosa) y trombocitos (verde). Figura 6B. Citograma modelo de las subpoblaciones de leucocitos en la ventana “extended” para la identificación de mononucleares (rojo) y heterófilos (marrón).	14
Figura 7. Histograma del volumen corpuscular medio de los eritrocitos.....	14
Figura 8. Linealidad y coeficiente de correlación de Pearson de los parámetros: Recuento de eritrocitos (RBC), Concentración de hemoglobina (HGB), Valor de hematocrito (HCT), Recuento de leucocitos (WBC), mononucleares, heterófilos y Trombocitos (PLT).	19
Figura 9. Citogramas del estudio del arrastre de una muestra concentrada (izquierda), seguida de una muestra poco concentrada (derecha).	20
Figura 10. Estudio de la estabilidad de las muestras de <i>O. mykiss</i> a diferentes tiempos y temperaturas, para: Recuento de eritrocitos (RBC), Concentración de hemoglobina (HGB), Valor de hematocrito (HCT), Volumen corpuscular medio (MCV), Recuento de leucocitos (WBC), mononucleares, heterófilos y Trombocitos (PLT).....	22
Figura 11. Citogramas e histogramas obtenidos por el Sysmex XN-1000V en las muestras de sangre de <i>O. mykiss</i> del estudio de la estabilidad, a diferentes tiempos y temperaturas.....	25
Figura 12. Diagramas de Bland-Altman para la comparación del Sysmex XN-1000V y el método manual (hemocitómetro y frotis sanguíneo) para: Recuento de eritrocitos (RBC), Valor de hematocrito (HCT), Recuento de leucocitos (WBC), mononucleares, heterófilos y Trombocitos (PLT). Los gráficos muestran la diferencia media (sesgo, línea punteada) entre ambos métodos y los límites de concordancia superior e inferior del 95 % (línea discontinua).	

Figura 13. Gráficos de Passing Bablok de Regresión Fit para la comparación del Sysmex XN-1000V y el método manual (hemocitómetro y frotis sanguíneo para: Recuento de

eritrocitos (RBC), Valor de hematocrito (HCT), Recuento de leucocitos (WBC), mononucleares, heterófilos y Trombocitos (PLT). Los gráficos muestran la dispersión de puntos alrededor de la recta de regresión y el sombreado representa el intervalo de confianza del 95 % de la recta de regresión.....	28
Figura 14. Estudio entre los anticoagulantes heparina y EDTA en los parámetros hematológicos: Recuento de eritrocitos (RBC), Concentración de hemoglobina (HGB), Valor de hematocrito (HCT), Volumen corpuscular medio (MCV), Recuento de leucocitos (WBC), mononucleares, heterófilos y Trombocitos (PLT).	29
Figura 15A. Citograma de una muestra de sangre con heparina. Figura 15B. Histograma de una muestra con heparina.	30
Figura 16A. Citograma de una muestra de sangre con EDTA. Figura 16B. Histograma de una muestra con EDTA.....	30
Figura 17. Estudio entre el anestésico MS-222 y el 2-fenoxietanol para los parámetros hematológicos: Recuento de eritrocitos (RBC), Concentración de hemoglobina (HGB), Valor de hematocrito (HCT), Volumen corpuscular medio (MCV), Recuento de leucocitos (WBC), mononucleares, heterófilos y Trombocitos (PLT).	31
Figura 18. Fotografías de <i>O. mykiss</i> con presencia de lesiones cutáneas en la aleta caudal, el opérculo y la inserción de las aletas ventrales.....	32
Figura 19. Fotografías de <i>O. mykiss</i> sin presencia de lesiones cutáneas.....	32
Figura 20. Estudio del efecto de las lesiones cutáneas sobre el hemograma en peces con lesiones cutáneas en relación a lo peces sin lesiones, para los parámetros hematológicos: Recuento de eritrocitos (RBC), Concentración de hemoglobina (HGB), Valor de hematocrito (HCT), Volumen corpuscular medio (MCV), Recuento de leucocitos (WBC), mononucleares, heterófilos y Trombocitos (PLT).....	33

RESUMEN

Los estudios hematológicos aportan información sobre el estado de salud de los animales y son importantes para la práctica veterinaria, la investigación científica y la acuicultura. Los analizadores hematológicos automáticos son una alternativa a los métodos manuales, permitiendo obtener resultados de forma rápida y fiable, no obstante, estos análisis aún no están sistematizados para la sangre de pez. Por ello, el objetivo del presente estudio es validar el analizador hematológico automático Sysmex XN-1000V para muestras de sangre de *Oncorhynchus mykiss* – trucha arcoíris (Walbaum, 1792), para mejorar la interpretación de los parámetros hematológicos publicados y poder ser utilizado para estudios futuros. Se analizaron 95 muestras de sangre heparinizada para las pruebas de validación (linealidad, arrastre, precisión) y estabilidad de las muestras. Se realizaron estudios comparativos entre el Sysmex XN-1000V y los métodos manuales (recuento celular en hemocitómetro y estimación en frotis). Los resultados obtenidos mostraron una buena correlación entre ellos. También se estudió la influencia del tipo de anticoagulante y el tipo de anestésico en los parámetros hematológicos: recuento de eritrocitos (RBC), concentración de hemoglobina (HGB), valor de hematocrito (HCT), volumen corpuscular medio (MCV), recuento de leucocitos (WBC) y recuento de trombocitos (PLT). Por último, se comprobó la eficacia del Sysmex XN-1000V para la detección de patologías y enfermedades inflamatorias a partir del hemograma, en un grupo de peces con lesiones cutáneas respecto a peces sin lesiones.

Palabras clave: analizador hematológico, parámetros hematológicos, *Oncorhynchus mykiss*, anticoagulante, anestésico.

ABSTRACT

Hematological studies provide information on the health condition of animals, which are important for veterinary medicine, scientific research and aquaculture. Automatic hematological analyzers are an alternative to manual methods, providing quicker and more reliable results. However, these analyzers have not yet been validated for fish blood. The objective of the present study is to validate the automatic hematology analyzer Sysmex XN-1000V for *Oncorhynchus mykiss* – rainbow trout (Walbaum, 1792) blood samples, to improve the interpretation of published hematological parameters and to be used in future studies. A total of 95 heparinized blood samples were analyzed for validation (linearity, carryover, precision) and sample stability test. Comparative studies between the Sysmex XN-1000V and manual methods (hemocytometer cell count and blood film estimation) were done. The obtained results show a good correlation between both methods. The influence of the type of anticoagulant and the type of anesthetic on the hematological parameters was also studied. These parameters are: red blood cell count (RBC), hemoglobin concentration (HGB), hematocrit value (HCT), mean corpuscular volume (MCV), white blood cell count (WBC) and platelet count (PLT). Finally, the Sysmex XN-1000V efficacy for the detection inflammatory diseases and pathologies was verified in a group of fish with skin lesions compared to fish without lesions.

Keywords: hematology analyzer, hematology parameters, *Oncorhynchus mykiss*, anticoagulant, anesthetic.

1. INTRODUCCIÓN

La hematología comprende el estudio de las células sanguíneas y sus precursores (médula ósea, ganglios linfáticos y bazo), permitiendo el diagnóstico, tratamiento y prevención de las patologías determinadas a partir del análisis de una muestra de sangre, un hemograma o un análisis hematológico (Fazio, 2019). El análisis de la sangre, fluido que circula por todos los órganos del cuerpo de un animal, puede aportar mucha información acerca del estado de salud de un organismo en respuesta a los cambios relacionados con la nutrición, el ambiente que lo rodea y posibles patologías (Fazio *et al.*, 2013).

El análisis hematológico puede ser una herramienta muy útil para evaluar el estado fisiológico y de salud de los animales que se encuentran bajo cuidados humanos, para el monitoreo de poblaciones salvajes que se encuentran en ecosistemas alterados o en zonas contaminadas, para estudios ecotoxicológicos e incluso para el estudio de especies que se encuentran en peligro de extinción. Además, la utilización de técnicas no letales resulta de vital importancia para los estudios que involucran a organismos vivos, como por ejemplo los peces, siendo importantes en el monitoreo ambiental de especies que se encuentran en peligro de extinción. El desarrollo de métodos no letales respalda el bienestar animal y sigue la actual legislación europea (Directiva 2010/63/UE) que tiene como objetivo reducir el número de animales utilizados para fines científicos, mejorar su salud y bienestar, así como afianzar firmemente el principio de las tres R en la experimentación con animales (reemplazo, reducción, refinamiento).

Las **células sanguíneas** de los peces (Figura 1) presentan diferencias significativas respecto a otros grupos de animales, ya que los **glóbulos rojos (eritrocitos)** y las **plaquetas (trombocitos)** son nucleados a diferencia de las células de los mamíferos que no presentan núcleo. Los **eritrocitos** son las células sanguíneas más abundantes en los peces (98 – 99 %) (Fänge, 1994) y contienen la proteína hemoglobina, que transporta el oxígeno por todo el organismo. Los **trombocitos** participan en el proceso de la coagulación y son indicadores del estado de salud del animal por la formación de barreras defensivas (Magnadóttir, 2006). Los **glóbulos blancos (leucocitos)** también son nucleados y forman parte del sistema inmunitario, ayudando a combatir infecciones y otras enfermedades. En condiciones normales predominan los linfocitos (95 – 99 %), seguido de los heterófilos (1 – 5 %) y los monocitos (1 %) (Fazio, 2019); los basófilos y eosinófilos raramente se observan en los peces teleósteos (Witeska *et al.*, 2022). Los linfocitos y los monocitos pertenecen al grupo de leucocitos mononucleares,

mientras que los heterófilos, basófilos y eosinófilos son polinucleares. Los heterófilos también son conocidos como neutrófilos en los mamíferos.

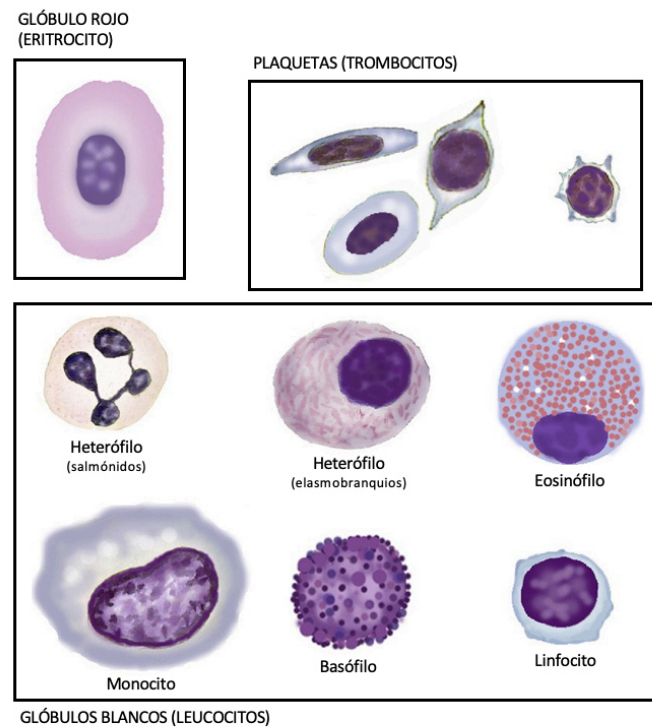


Figura 1. Esquema de los diferentes tipos de células sanguíneas en peces. Imagen extraída de Claver y Quaglia (2009).

Hasta la fecha, la mayoría de estudios de evaluación hematológica en peces se basan en técnicas hematológicas manuales, utilizando un hemocitómetro (cámara de Neubauer) y un microscopio óptico para el recuento celular de glóbulos rojos, glóbulos blancos y trombocitos (Shah y Altinda, 2005 y Shah, 2010), además de la estimación y el estudio diferencial de leucocitos en frotis sanguíneo.

La evaluación hematológica incluye la determinación del recuento total de eritrocitos (RBC, del inglés “red blood cell count”), la concentración de hemoglobina (HGB, del inglés “hemoglobin concentration”), el valor de hematocrito (HCT, del inglés “hematocrit value”), el volumen corpuscular medio (MCV, del inglés “mean corpuscular volume”), la hemoglobina corpuscular media (MCH, del inglés “mean corpuscular hemoglobin”), la concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC, del inglés “mean corpuscular hemoglobin concentration”), el recuento de leucocitos (WBC, del inglés “white blood cell count”) y el recuento diferencial de leucocitos (DLC, del inglés “differential leukocyte count”): linfocitos (Lym, del inglés “lymphocyte”), heterófilos (Het, del inglés “heterophil”), monocitos (Mono, del inglés “monocyte”), eosinófilos (Eos, del inglés “eosinophil”) y basófilos (Bas, del inglés

“basophil”) (Witeska et al., 2022). También se estudia el recuento de trombocitos (PLT, del inglés “platelet count”) y las proteínas plasmáticas totales (PT, del inglés “total proteins”).

El análisis hematológico manual requiere tener unos conocimientos, habilidades y experiencia para obtener resultados fiables y reproducibles (Witeska et al., 2022), además de tener múltiples fuentes de error durante el proceso, como la dilución inadecuada de la sangre, las tinciones y la carga incorrecta de la cámara del hemocitómetro, que pueden llevar a una mala interpretación de los resultados (Fazio, 2019).

Los analizadores hematológicos automatizados son una alternativa a los métodos manuales que se usan de forma rutinaria tanto en medicina humana como en veterinaria. Estos analizadores permiten el ahorro de mano de obra, mayor velocidad, y resultados más reproducibles durante un largo período de tiempo, optimizando el diagnóstico, tratamiento y mejorando la eficacia de la terapia aplicada (Fazio, 2019). No obstante, el uso de analizadores automáticos aún no está sistematizado para el análisis de sangre de pez, lo que representa una necesidad de su estudio por la falta de información en esta área y la estandarización de los métodos analíticos para hacerlo posible.

A pesar de que los primeros estudios hematológicos en peces datan de los años 50 (Field et al., 1943), todavía no se han establecido valores de referencia de parámetros hematológicos para la mayoría de las especies de peces, probablemente por la variabilidad entre especies y por la dificultad para estandarizar los métodos (Hrubec et al., 2001 y Parrino et al., 2018), lo cual dificulta la interpretación de los estudios. Por ello es de vital importancia automatizar el análisis de muestras de sangre de pez, optimizando el uso de analizadores hematológicos.

Los primeros estudios automatizados en peces utilizan citometría de flujo y microscopía de luz (Parrino et al., 2018). Otros estudios recientes han utilizado un analizador automatizado HeCo Vet C (SEAC, Florencia, Italia) con un sistema de análisis de impedancia para el análisis de muestras de sangre en salmonetes (*Mullus surmuletus*) y carpas doradas (*Carassius auratus*). Este método fue validado previamente en el campo veterinario, posteriormente se modificaron los resultados con un programa de software (SEAC, Florencia, Italia), el cual permite determinar el recuento de leucocitos con una solución de lisis, que rompe los eritrocitos y libera los núcleos permitiendo su recuento; una vez contados se restan al total de leucocitos (Faggio et al., 2013 y Fazio et al., 2013).

El análisis de los parámetros hematológicos puede ser un método rápido, práctico y económico para identificar enfermedades infecciosas en peces (Tavares-Dias y Oliveira, 2009

y Fazio, 2019), las cuales son una limitación importante en la industria de la acuicultura (Smith et al., 2003), un sector que permite satisfacer las necesidades de seguridad alimentaria y nutricional de una población humana que se encuentra en rápida expansión (Fazio, 2019).

La acuicultura es una actividad dirigida a la producción y al engorde de organismos acuáticos en su medio natural o en zonas de cultivo, bajo condiciones controladas, de especies importantes para el ser humano (FAO, 2016). Actualmente, suministra el 50 % de todo el pescado que se consume en el mundo, y se prevé que para el 2030 la producción acuícola sea la principal fuente de pescado, por la demanda de consumidores y el agotamiento de la pesca de captura salvaje (FAO, 2016).

La especie utilizada en el presente estudio es *Oncorhynchus mykiss* – trucha arcoíris (Walbaum, 1792), un pez de agua dulce que pertenece a la familia de los salmónidos, con especies importantes a nivel ecológico y acuícola. Se distribuyen de forma nativa en los ríos y lagos de agua fría de la costa del Pacífico Norte (Stanković et al., 2015; Singh, 2020 y Farahnak Roudsari et al., 2021) y posteriormente fue introducida con fines de acuicultura y pesca deportiva, estando presente en todos los continentes excepto en la Antártida (Cosewicz, 2014). Esta especie es una de las más utilizadas en estudios científicos, siendo especie modelo en estudios ecotoxicológicos y es relativamente fácil de mantener bajo cuidados humanos. Su importancia comercial en el sector de la acuicultura se debe a la alta calidad de su carne, el cultivo simple, la resistencia a enfermedades y el éxito reproductivo en condiciones de cautividad. Según las últimas estadísticas publicadas, 80 países como Japón, Irán, Estados Unidos, Chile, Noruega, Dinamarca, Turquía, Italia y Alemania cultivan alrededor de 814 mil toneladas de trucha arcoíris, con un valor de producción global de más de 3,6 millones de dólares estadounidenses (FAO Yearbook, 2017).

Existen varios factores que pueden interferir con el análisis hematológico, por ello es importante estandarizar la metodología utilizada, desde la toma de muestras de sangre hasta el análisis de los parámetros. Algunos de los factores que interfieren con los resultados hematológicos son, por ejemplo, el manejo del animal durante la extracción de sangre, dando lugar a una respuesta fisiológica de estrés (Weber et al., 2007). Se recomienda la sedación previa a la extracción de sangre, para disminuir los cambios hematológicos producidos por el estrés (Hrubec y Smith, 2010 y Weiss et al., 2010), que pueden alterar la muestra por el aumento de la coagulación, siendo mayor en los peces más estresados (Tavares-Dias y Oliveira, 2009).

Algunos parámetros a tener en cuenta a la hora de elegir un anestésico son el tiempo de inducción de la anestesia (menor a 3 minutos), el tiempo de recuperación del pez (menor a 5 minutos), que no presente toxicidad para los peces ni para las personas que lo manipulan, no deben generar efectos fisiológicos prolongados ni residualidad en los tejidos, no deben causar mortalidad en el período posterior al anestésico, deben tener una alta solubilidad tanto en agua dulce como en agua salada y deben ser económicamente asequible y fácil de obtener (King et al., 2005 y Topic Popovic et al., 2012).

El anestésico triclaína metanosulfonato (MS-222) es el más utilizado en la acuicultura desde su introducción en 1967 (Topic Popovic et al., 2012) y está regulado por la Unión Europea (UE) y por los Estados Unidos (EEUU) (Del Santo O'Neill et al., 2016). Además, es el único anestésico aprobado por la FDA ("Food and Drug Administration") y por la EPA ("Environmental Protection Agency") para ser utilizado en peces aptos para el consumo humano (Topic Popovic et al., 2012). Tiene una alta solubilidad tanto en agua dulce como en agua salada (Ross y Ross, 2008 y Del Santo O'Neill et al., 2016). Otros anestésicos utilizados en peces son el 2-fenoxietanol, quinaldina, eugenol (aceite de clavo), etomidato o el hielo para aturdirlos. Algunos pueden ser tóxicos y por ello se deben realizar pruebas piloto antes de elegir el anestésico, la dosis y el tiempo apropiado para una especie y tamaño de pez en particular (Witeska et al., 2022).

También es importante añadir un anticoagulante inmediatamente después de la extracción de sangre para evitar la formación de coágulos. La heparina es el anticoagulante más utilizado para la evaluación hematológica en sangre de pez (Walencik y Witeska, 2007; Hrubec y Smith, 2010 y Weiss et al., 2010) y es el que presenta menor riesgo de causar artefactos en las muestras de sangre. El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) es otro de los anticoagulantes utilizados en la bibliografía, pero puede producir cambios en la morfología de los glóbulos rojos e interfiere con el anestésico MS-222, comúnmente utilizado en peces (Walencik y Witeska, 2007 y Weiss et al., 2010). La concentración utilizada de anticoagulante puede afectar a los resultados de los análisis hematológicos, por ello debe dosificarse con precisión y ajustarse al volumen de la muestra de sangre a estudiar (Witeska et al., 2022).

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Realizar una validación completa del analizador hematológico Sysmex XN-1000V para el análisis hematológico de muestras de sangre de *O. mykiss*, con la intención de poder disponer de un sistema automatizado válido, fiable y rápido para futuros estudios hematológicos en salmónidos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Conocer las técnicas de análisis hematológico manuales que se utilizan en el laboratorio para la realización de los recuentos celulares en la cámara de Neubauer y la estimación en frotis sanguíneo.

Evaluar el Sysmex XN-1000V para su uso en salmónidos utilizando el canal denominado “birds” implementado recientemente por la casa comercial (Sysmex Corporation, Kobe, Japón) y crear un canal específico para peces.

Valorar el efecto de los anticoagulantes heparina y EDTA en los parámetros hematológicos de muestras de sangre de *O. mykiss* mediante el Sysmex XN-1000V.

Evaluar el efecto de los anestésicos utilizados previamente a la extracción sanguínea sobre los parámetros hematológicos de las muestras de sangre de *O. mykiss* analizadas con el Sysmex XN-1000V.

Determinar la utilidad del hemograma obtenido mediante el Sysmex XN-1000V en peces con presencia de lesiones cutáneas, en comparación con peces sin lesiones, y ver si el analizador es capaz de detectar alteraciones hematológicas en situaciones patológicas.

Obtener valores de referencia fiables para las muestras de sangre de *O. mykiss* a partir del analizador hematológico y compararlos con la bibliografía publicada hasta la fecha.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. PECES DEL ESTUDIO

Los ejemplares de *O. mykiss* utilizados en este estudio eran truchas arcoíris adultas, con un peso aproximado de 150 g, obtenidos de una piscifactoría local (Piscifactoría Andrés, St. Privat d'en Bas, España) y trasladados al estabulario de peces de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Las truchas se aclimataron a las condiciones del laboratorio durante 1 mes y se mantuvieron en un sistema cerrado de recirculación de agua dulce, a 15 °C y con un fotoperíodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Se les suministró una dieta de mantenimiento en base al 3 % de su peso corporal, una vez al día, de la casa comercial "Trouw nutrition" S.A.U., España.

En el estabulario los peces se mantienen en un tanque de aproximadamente 1000L y una densidad de 8,4 kg/m³ de peces por tanque. Se monitorizaron periódicamente el oxígeno disuelto (< 9 mg/L), el pH (6,0 – 8,5), el nitrito (< 0,05 mg/L), el nitrato (< 1,0 mg/L) y el amoníaco (< 0,07 mg/L) a lo largo del estudio. Las tareas de mantenimiento incluían la renovación del agua para asegurar unas condiciones óptimas de calidad del agua y promover el buen estado de salud de los peces del estudio.

Para los estudios hematológicos del presente estudio se utilizó la sangre de 95 peces con el anticoagulante heparina (Sigma, USA). De estos 95 peces, 83 fueron anestesiados con la solución de triclaína metanosulfonato (MS-222) (Sigma, USA) y 18 con 2-fenoxietanol (Sigma, USA). Para el estudio del tipo de anticoagulante, se seleccionaron 19 truchas y tras extraerles sangre esta se dividió en dos microtubos de 1,5 mL, a uno se le añadió el anticoagulante heparina y al otro el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Sigma, USA).

El mantenimiento de los peces y los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo al Comité Ético de la Universidad Autónoma de Barcelona y de acuerdo a los Principios Rectores Internacionales para la Investigación Biomédica con Animales (Directiva 2010/63/UE).

3.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Los peces de *O. mykiss* del presente estudio se eligieron al azar y se trasladaron a un recipiente con agua, con una concentración de solución anestésica de MS-222 conocida. Para la realización de los análisis hematológicos en los que necesitábamos obtener un volumen de sangre de 150 – 200 μ L por pez, utilizamos una solución anestésica subletal de MS-222 de 5 mg/L, suficiente para reducir el estrés y prevenir daños durante la manipulación. Por otro lado, los peces a los que se les pretendía extraer un volumen de 500 – 1000 μ L de sangre para poder realizar los diferentes análisis de validación del Sysmex XN-1000V fueron sacrificados previamente con una concentración anestésica letal de MS-222 de 1g/L, para evitar el sufrimiento de los animales. La extracción de sangre se realizó mediante una punción venosa caudal con una aguja de 0,8 mm y una jeringa heparinizada de 2 mL. Para preservar las muestras y evitar la aparición de coágulos se utilizó la heparina líquida como anticoagulante, añadiendo 25 μ L de heparina por 1 mL de sangre (25:1000). Después de la extracción, los peces se trasladaron a un segundo recipiente de agua fresca sin anestésico para favorecer su recuperación (en el caso de los animales a los que se les extrajo menor cantidad de sangre), antes de ser trasladados al tanque de cuarentena.

3.3. MÉTODO MANUAL

Las técnicas de análisis hematológico permiten diagnosticar cambios en la salud de los animales como presencia de enfermedades inflamatorias a partir del análisis de muestras biológicas. Las técnicas manuales que realizamos fueron la determinación del valor de hematocrito, la determinación de las proteínas plasmáticas totales, el recuento de leucocitos y eritrocitos en un hemocitómetro, la estimación y el diferencial de leucocitos en una preparación de frotis sanguíneo y la estimación de trombocitos en frotis sanguíneo.

3.3.1. VALOR DE HEMATOCRITO

El valor de hematocrito (HCT) se obtuvo colocando las muestras de sangre en los tubos capilares de microhematocrito. La sangre sube por capilaridad y una vez que se llena el 70 – 90 % de su capacidad, se tapa el extremo superior con el dedo índice y se sella el extremo inferior con plastilina específica para el efecto (Hirschmann, Alemania). Este proceso se

realizó para cada una de las muestras por duplicado. Luego se colocaron los capilares en una centrífuga específica para microhematocritos, modelo Centromix II BL (Selecta, España) (Figura 2A), a 12.000 rpm durante 5 minutos, para favorecer el empaquetamiento de los eritrocitos y separarlos del plasma.

El HCT se determinó de forma manual con los tubos capilares de microhematocrito con las capas celulares empaquetadas (Figura 2B) y una plantilla de medición. Para ello, se situó la interfase eritrocito-arcilla del capilar en la línea del 0 y la parte superior de la capa del plasma en la línea del 100. Después, se hizo coincidir la línea móvil de la regla de lectura con la línea que divide la capa eritrocitaria de la capa del plasma, que a su vez determina el porcentaje del HCT con la escala lateral.

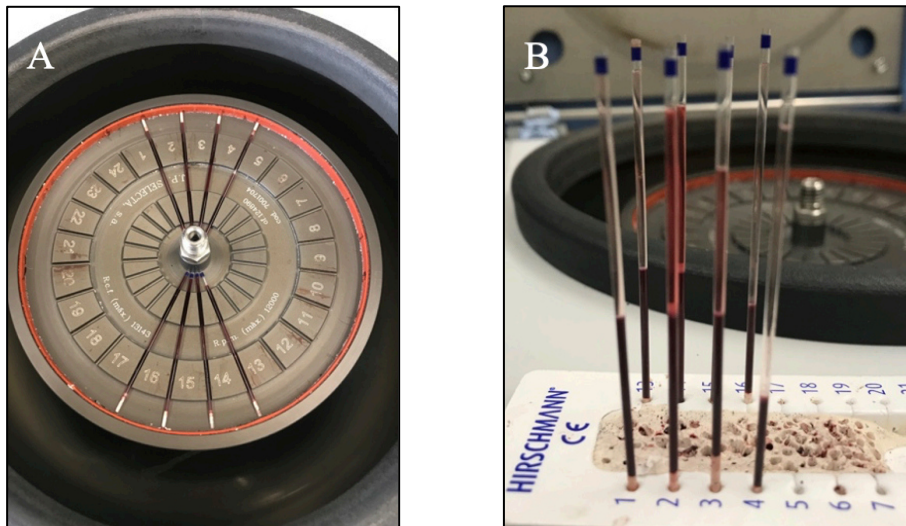


Figura 2A. Tubos capilares de microhematocrito en la centrífuga específica para microhematocritos Centromix II BL. **Figura 2B.** Tubos capilares de microhematocrito con el empaquetamiento de eritrocitos, leucocitos y plasma después de ser centrifugados.

3.3.2. PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

La estimación de la concentración de las proteínas plasmáticas totales (PT) se obtuvo usando un refractómetro (Euromex, Holanda), de manera que el soluto refracta la luz que pasa a través del refractómetro, que es proporcional a la concentración del soluto del plasma. El resultado se puede leer en una escala a través del ocular del refractómetro y se expresa en g/L. Para conocer las proteínas totales se utilizó la capa plasmática (como soluto) del tubo capilar de microhematocrito obtenida a partir de la centrifugación.

3.3.3. RECUENTO DE LEUCOCITOS Y ERITROCITOS

Para el recuento celular se utilizó un hemocitómetro o cámara de Neubauer y un microscopio óptico. Las muestras de sangre heparinizadas se diluyeron al añadir 5 μL de sangre a un microtubo de 1,5 mL con 995 μL de una solución preparada de Natt-Herrick comercial (Bioanalytic GmbH, Alemania), con la ayuda de una micropipeta automática. Después de 5 minutos, se cargaron 10 μL de la dilución en la cámara de Neubauer (Figura 3A), con la micropipeta automática y se esperó 5 minutos a que las células se asentaran, luego se observó en el microscopio óptico con el objetivo de 40X.

La cámara de Neubauer es un portaobjetos con una cuadrícula central de 9 campos, subdivididos en cuadrículas más pequeñas (0,25 x 1,0 mm) (Figura 3B). El recuento celular de leucocitos es la suma del número de leucocitos dentro de los 9 campos y el recuento de eritrocitos sólo tiene en cuenta el número de eritrocitos que se encuentran en 5 de las cuadrículas del campo central, porque estos son más abundantes que los leucocitos.

Los recuentos celulares se calculan:

$$\text{WBC} = n^{\circ} \text{ leucocitos} \times 200$$

$$\text{RBC} = (n^{\circ} \text{ eritrocitos} + 10\% n^{\circ} \text{ eritrocitos}) \times 10.000$$

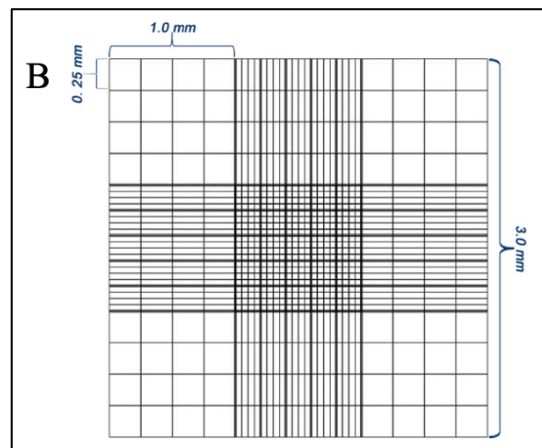


Figura 3A. Hemocitómetro o cámara de Neubauer. **Figura 3B.** Cuadrícula de la cámara de Neubauer. Imagen obtenida de: <https://blogceta.zaragoza.unam.mx/manualbct2/anexo-2-camara-de-neubauer/>.

3.3.4. ESTIMACIÓN Y DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS

Para el cálculo de la estimación y el diferencial de leucocitos se realizó una preparación de frotis sanguíneo añadiendo entre 1 y 3 μL de sangre de cada una de las muestras, por duplicado, y se tiñeron con la tinción de Romanowsky modificado de panóptico (Química

Clínica Aplicada S.A., Tarragona), que es una mezcla de azul de metileno y eosina que tiñe de púrpura los núcleos y gránulos neutrofilicos, de azul el citoplasma y de rosa los eritrocitos. Esta tinción permite apreciar la forma, tamaño y contorno de las células sanguíneas en el microscopio óptico.

La **estimación leucocitaria** se obtuvo contando los leucocitos de 10 campos de visión en el microscopio óptico, utilizando el objetivo 40 X y aplicando la fórmula:

$$X = (\Sigma/10) \times 1600$$

El **diferencial leucocitario** se calculó contando 100 leucocitos en varios campos del frotis sanguíneo, con el objetivo de 100 X, diferenciando entre los distintos tipos de leucocitos: linfocitos, heterófilos y monocitos (los basófilos y eosinófilos raramente se observan) (Figura 4). El resultado se expresó en porcentaje.

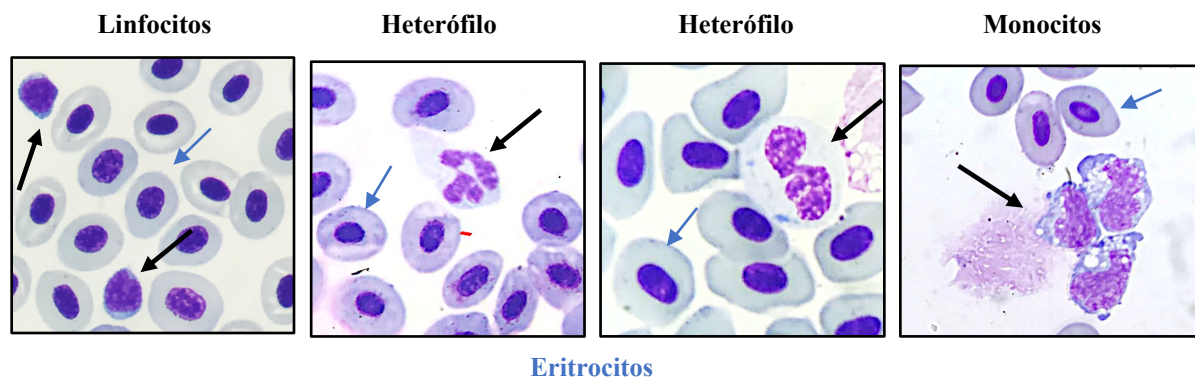


Figura 4. Diferenciación entre eritrocitos (flecha azul) y los leucocitos (flecha negra) en una muestra de frotis sanguíneo observada en el microscopio óptico con el objetivo de 100 X. Los diferentes tipos de leucocitos que se observan son: linfocitos (izquierda), heterófilos (centrales) y monocitos (derecha).

3.3.5. ESTIMACIÓN DE TROMBOCITOS

La **estimación de trombocitos** se obtuvo a partir del frotis sanguíneo utilizado para la estimación de leucocitos, contando los trombocitos que aparecen en 10 campos de visión, con el aumento de 100 X (Figura 5). Después, se aplicó la fórmula:

$$X = ((\Sigma/10) / 1000) \times 3.500$$

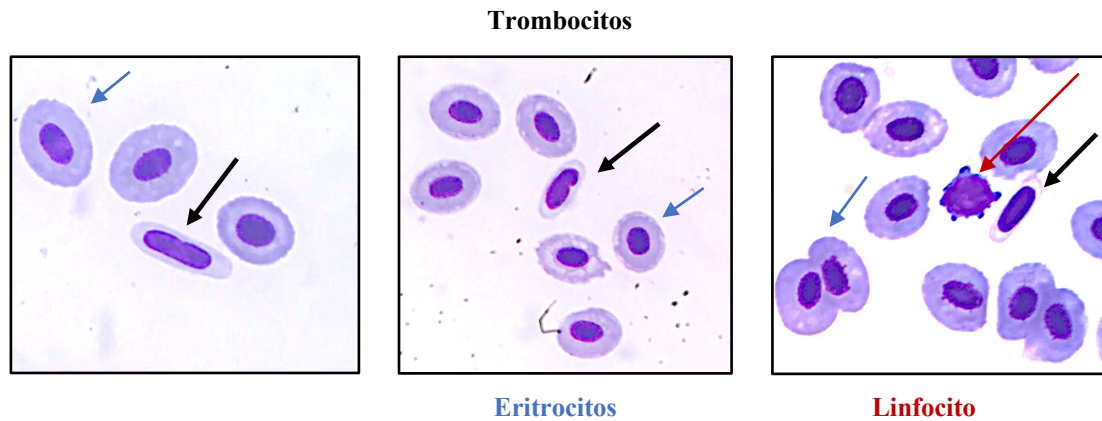


Figura 5. Observación de trombocitos (flecha negra) en una muestra de frotis sanguíneo, observada en el microscopio óptico con el aumento de 100 X. En la preparación también se observan eritrocitos (flecha azul) y linfocitos (flecha roja).

Para los análisis hematológicos se utilizaron muestras de sangre de distintas truchas con heparina como anticoagulante, pero para el estudio comparativo entre anticoagulantes, se obtuvo sangre de un mismo pez y se dividió en dos microtubos de 1,5 mL, en uno se añadió heparina y en el otro EDTA, siguiendo las mismas recomendaciones descritas con anterioridad para la heparina.

Todos los peces del estudio fueron anestesiados con el anestésico MS-222 antes de la extracción de sangre, excepto un grupo de peces, seleccionados al azar, a los que se les anestesió con el anestésico 2-fenoxietanol, para evaluar si los dos tipos de anestésico afectaban a los parámetros hematológicos y de qué forma.

Todos los recuentos celulares que se realizaron de forma manual para la comparación de métodos fueron realizados por duplicado y por parte de dos observadores, después se calculó la media de los resultados para obtener valores más precisos.

El estudio de la precisión del recuento celular en el método manual se realizó analizando una muestra de sangre por triplicado y por dos observadores distintos. Los estudios de precisión se realizaron de forma individual, desde la dilución de la muestra a la carga de la cámara de Neubauer y el recuento celular; empezando de cero en cada réplica. El observador 1 era un observador con experiencia en el recuento celular de las células de peces, mientras que el observador 2 contaba con menor experiencia.

3.4. MÉTODO AUTOMÁTICO – SYSMEX XN-1000V

El Sysmex XN-1000V es un analizador hematológico de citometría de flujo e impedancia, con un software multiespecie versión betta 3.05 (Sysmex Corporation, Kobe, Japón). Durante todo el periodo de análisis se analizó diariamente material de control de calidad L2 XN Check (Sysmex Co., Kobe, Japón), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. En la Tabla 1 se describe el método y el canal utilizado por el analizador para cada uno de los parámetros analizados en cada una de las muestras de sangre del estudio.

La sangre de *O. mykiss* se analizó con el perfil de aves del analizador hematológico. Este perfil utiliza el canal PLT-F que emplea el Fluorocromo Fluorocell PLT (Sysmex Co., Kobe, Japón), que permite identificar la población de células de eritrocitos nucleados, leucocitos y trombocitos (Figura 6A). El canal PLT-F clasifica las células analizadas con la luz dispersada hacia delante (FSC), la luz dispersada lateral (SCC) y la luz fluorescente lateral (SFL). Todas las poblaciones identificadas por el analizador hematológico fueron corregidas de forma manual para ajustarse mejor al citograma poblacional (Figura 6A). También se utilizó el canal de análisis “extended”, que es una pantalla extra del software, que nos permite identificar y delimitar de forma manual dos poblaciones de leucocitos del hemograma denominadas células mononucleares y heterófilos, en porcentaje y recuento (Figura 6B).

Tabla 1. Métodos y canales utilizados para los parámetros hematológicos analizados.

PARÁMETROS ANALIZADOS	CANAL UTILIZADO
RBC	Canal PLT-F
HGB	Método SLS-hemoglobina
HCT	Calculado a partir del tamaño de RBC
MCV	Distribución del tamaño de RBC
MCH	Distribución del tamaño y fluorescencia de RBC
MCHC	Distribución del tamaño y fluorescencia de RBC
WBC	Canal PLT-F
PLT	Canal PLT-F
RDW-SD	Distribución del tamaño de RBC
RDW-CV	Distribución del tamaño de RBC

RBC = Recuento de eritrocitos; HGB = Concentración de hemoglobina; HCT = Valor de hematocrito; MCV = Volumen corpuscular medio; MCH = Hemoglobina corpuscular media; MCHC = Concentración de hemoglobina corpuscular media; WBC = Recuento de leucocitos; PLT = Trombocitos; RDW-SD = Desviación estándar del ancho de distribución de eritrocitos (del inglés “red cell distribution width standard deviation”) RDW-CV = Coeficiente de variación del ancho de distribución de eritrocitos (del inglés “red cell distribution width coefficient of variation”).

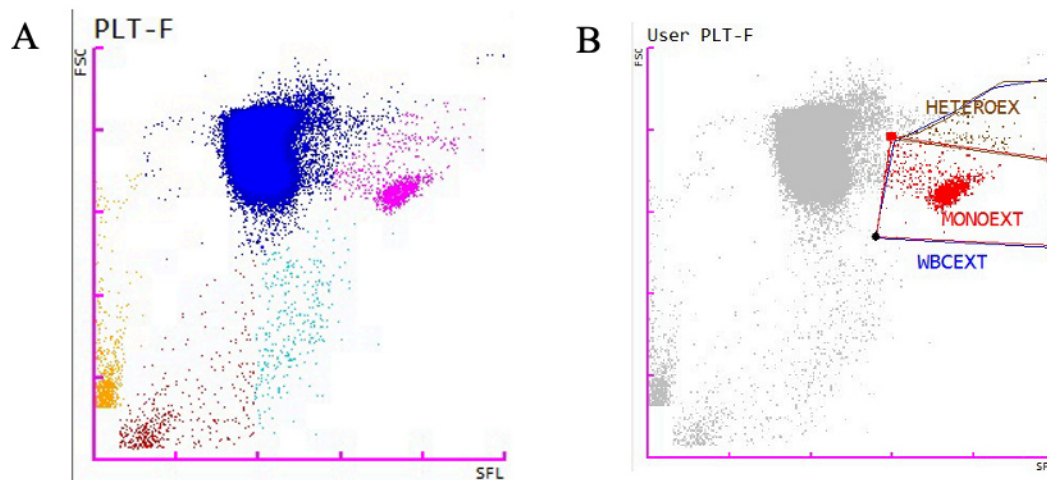


Figura 6A. Citograma modelo del canal de aves del Sysmex XN-1000V de las diferentes poblaciones celulares: eritrocitos (azul), leucocitos (rosa) y trombocitos (verde). **Figura 6B.** Citograma modelo de las subpoblaciones de leucocitos en la ventana “extended” para la identificación de mononucleares (rojo) y heterófilos (marrón).

El volumen corpuscular medio (MCV) de los eritrocitos se muestra gráficamente como un histograma (Figura 7) que permite visualizar la distribución del tamaño celular.

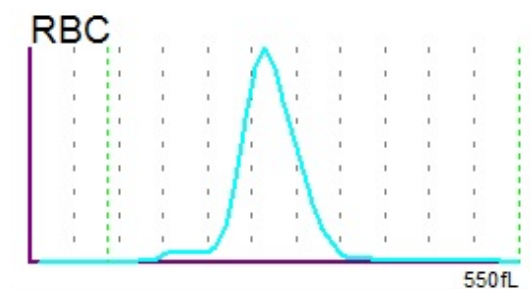


Figura 7. Histograma del volumen corpuscular medio de los eritrocitos.

3.4.1. LINEALIDAD

La linealidad permite evaluar la capacidad del analizador para obtener resultados proporcionales a la concentración en un rango establecido. Se estudió para el recuento de los parámetros: RBC, HGB, HCT, WBC, heterófilos, mononucleares y PLT. Para evaluar la linealidad del Sysmex XN-1000V, se analizaron por duplicado las muestras de sangre de un mismo pez, en una dilución en serie del 100 %, 75 %, 50 %, 25 %, 12,5 % y 6,25 %. La muestra de sangre fresca (100 %) se diluyó con el diluyente Cellpack DCL del Sysmex XN-1000V (Sysmex Co., Kobe, Japón), con la ayuda de una micropipeta automática de precisión.

3.4.2. ARRASTRE (“CARRY-OVER”)

El arrastre permite conocer la influencia que tiene una muestra sobre la siguiente si no se realiza ningún procedimiento de lavado entre ellas. Se determinó el arrastre para el recuento de RBC, WBC y PLT. Para ello se analizó por triplicado una muestra con valores altos (H1, H2, H3), seguida de una muestra con valores bajos, en este caso se utilizó el diluyente Cellpack DCL (Sysmex Co., Kobe, Japón) (L1, L2, L3) por triplicado. La muestra con valores altos se obtuvo centrifugando la muestra de sangre fresca en una centrífuga específica para microtubos de 1,5 mL, modelo Rotofix 32 A (Hettich, Alemania) a 2.520 rpm durante 5 minutos y eliminando cerca del 80 % del plasma obtenido.

El arrastre se calculó con la siguiente fórmula y su resultado se expresó como un porcentaje.

$$\text{Arrastre} = [(L1 - L3)/(H3 - L3)] \times 100$$

3.4.3. PRECISIÓN

La precisión es la capacidad que tiene el analizador en repetir siempre un mismo resultado. Para ello se analizó en el Sysmex XN-1000V una muestra de sangre por triplicado con valores normales y otra muestra de sangre con valores altos, también por triplicado. La precisión se calculó con la fórmula del coeficiente de variación (CV):

$$\text{CV} = (\text{Media}/\text{Desviación estándar}) \times 100$$

La precisión también se estudió con el método manual para el recuento de eritrocitos y leucocitos a partir del análisis de 3 muestras por parte de dos observadores, uno dotado de más experiencia que el otro en recuentos celulares. El procedimiento se realizó por triplicado y de forma individual desde la dilución de la muestra en la solución de Natt-Herrick hasta el recuento celular en la cámara de Neubauer.

3.4.4. ESTABILIDAD

La estabilidad es el tiempo que transcurre desde el momento de la extracción de sangre al análisis de la muestra y se estudia porque con el paso del tiempo la muestra puede deteriorarse y alterar los resultados. La estabilidad se determinó utilizando 2 mL de sangre de cuatro truchas, dividido en dos microtubos de 1,5 mL con 1 mL de sangre heparinizada cada uno. Una de las muestras de cada trucha fue almacenada a temperatura ambiente y la otra fue

refrigerada a 4 °C. Las muestras se analizaron en los siguientes tiempos posteriores a la extracción: 0 h, 4 h, 6 h, 24 h, 48 h y 72 h, tanto para las muestras a temperatura ambiente como para las refrigeradas a 4 °C. Todas las muestras se homogeneizaron durante 5 minutos antes de ser analizadas por el Sysmex XN-1000V.

3.4.5. COMPARACIÓN DE MÉTODOS

El estudio comparativo entre el método manual (recuentos en el hemocitómetro y en el frotis sanguíneo) y el analizador hematológico Sysmex XN-1000V se realizó mediante el análisis de 95 – 100 muestras de sangre heparinizadas de distintos peces, dentro de las 6 horas posteriores a la extracción de sangre. Se comparó el valor del hematocrito del analizador hematológico con el valor del hematocrito manual obtenido mediante la centrifugación de los tubos capilares de microhematocrito.

También se compararon los recuentos celulares de eritrocitos, leucocitos y trombocitos obtenidos por el analizador hematológico con los recuentos celulares del método manual. Se realizó un frotis sanguíneo de cada muestra por duplicado y los frotis fueron teñidos con la tinción de Romanowsky modificado de panóptico (Química Clínica Aplicada S.A., Tarragona) y se estimó el WBC y PLT (ver apartado 3.3. Método manual). También se estimó el porcentaje de las poblaciones leucocitarias (linfocitos, monocitos, heterófilos, eosinófilos y basófilos) sobre un recuento de 100 células.

3.5. ESTUDIO DEL TIPO DE ANTICOAGULANTE

El estudio comparativo entre los dos tipos de anticoagulante utilizados (heparina y EDTA) en las muestras de sangre de *O. mykiss*, se realizó mediante el análisis de sangre de 19 peces seleccionados al azar, a los cuales se les extrajo sangre y esta se dividió en dos microtubos de 1,5 mL, en uno se añadió el anticoagulante heparina y en el otro el EDTA. Los peces de este estudio fueron anestesiados previamente a la extracción de sangre con el anestésico MS-222. Las muestras de sangre fueron analizadas en las 3 horas siguientes a la extracción con el analizador hematológico Sysmex XN-1000V.

3.6. ESTUDIO DEL TIPO DE ANESTESIA

Para estudiar cómo influye el tipo de anestésico utilizado en los parámetros hematológicos de las muestras de sangre de *O. mykiss* estudiadas, se seleccionaron 18 truchas al azar y se les anestesió con el anestésico 2-fenoxietanol antes de la extracción de sangre, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para los peces anestesiados con el anestésico MS-222. Los resultados se compararon estadísticamente con las 83 muestras de sangre de los peces a los que se les anestesió con el anestésico MS-222. A todas las muestras de sangre de este estudio se les añadió heparina como anticoagulante para evitar coágulos en las muestras.

3.7. ESTUDIO DEL EFECTO DE LESIONES CUTÁNEAS SOBRE EL HEMOGRAMA

Tras observar una población de peces con presencia de lesiones cutáneas, debido a la inadecuada calidad del agua, se realizó un estudio para ver si el analizador hematológico Sysmex XN-1000V era capaz de detectar patologías a partir de la detección de alteraciones hematológicas. Para ello se realizó un estudio comparativo entre las muestras de sangre de 17 peces con presencia de lesiones cutáneas, respecto a las muestras de sangre de un grupo control de 50 peces que no presentaban lesiones cutáneas aparentes. Todos los peces de este estudio fueron anestesiados con el anestésico MS-222 y la sangre fue conservada con heparina como anticoagulante.

3.8. VALORES DE REFERENCIA

Siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Estadounidense de Patología Clínica Veterinaria (ASVCP) (Arnold et al., 2019) se analizaron 71 muestras de sangre de *O. mykiss* de ejemplares que no presentaban lesiones cutáneas, anestesiados con el anestésico MS-222 previamente a la extracción de sangre y utilizando heparina como anticoagulante, con el objetivo de obtener valores de referencia para esta especie.

3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

La **linealidad** se estudió mediante la regresión lineal y el coeficiente de correlación de Pearson. La **precisión** se evaluó mediante el coeficiente de variación (CV). Se estudió la distribución normal de las diferentes variables mediante la prueba de Shapiro-Wilk y se utilizaron pruebas paramétricas para aquellos parámetros que seguían una distribución normal y pruebas no paramétricas para los que no presentaban una distribución normal.

El análisis estadístico de la **estabilidad**, en relación a los efectos del tiempo y la temperatura de almacenamiento, se realizó mediante una prueba de Friedman con comparación múltiple de Dunn.

En el estudio de **comparación de métodos**, se utilizó una correlación lineal de Spearman, una regresión no paramétrica de Passing-Bablok y un análisis de Bland-Altman.

La evaluación de las diferencias significativas entre las muestras de sangre tratadas con los dos tipos de **anticoagulantes** heparina y EDTA, se realizó mediante una prueba no paramétrica de Wilcoxon pareada. En el análisis estadístico utilizado para comparar los efectos del tipo de **anestésico** utilizado, se usó la prueba de Mann Whitney para comparar los dos grupos. En el estudio en el cual se compararon los peces con **lesiones cutáneas** respecto a los peces sin lesiones cutáneas, se realizó la prueba T-student para los datos independientes y parámetros con distribución normal o el test de Mann Whitney para parámetros con distribución no normal. Para el análisis estadístico de los **valores de referencia** se siguieron las recomendaciones de la Sociedad Estadounidense de Patología Clínica Veterinaria (ASVCP) debido a que la mayoría de los parámetros no seguían una distribución normal, por lo que la población se definió con la media, mediana, mínimo, máximo, percentil 5 % y percentil 95 % se utilizan para definir la población del estudio (Arnold et al., 2019). El percentil 5 % y 95 % define el rango de referencia para la especie.

Para los estudios de análisis estadístico se utilizó el programa estadístico Graphpad Prism 8.0.1. (San Diego, Ca, EE.UU.). El análisis de regresión de Passing-Bablok se realizó mediante el programa informático estadístico R, en versión 3.6.2, con el paquete mcr (www.r-project.org). El nivel de significación se fijó en $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. MÉTODO AUTOMÁTICO – SYSMEX XN-1000V

4.1.1. LINEALIDAD

En la Figura 8 se muestra la linealidad de los parámetros RBC, HGB, HCT, WBC, recuento de mononucleares, recuento de heterófilos y PLT. La linealidad fue aceptable para todos los parámetros y el coeficiente de correlación de Pearson fue superior a 0,9 en todos los casos. Sin embargo, se observó una desviación estadísticamente significativa de cero ($p < 0,005$) para todos los parámetros.

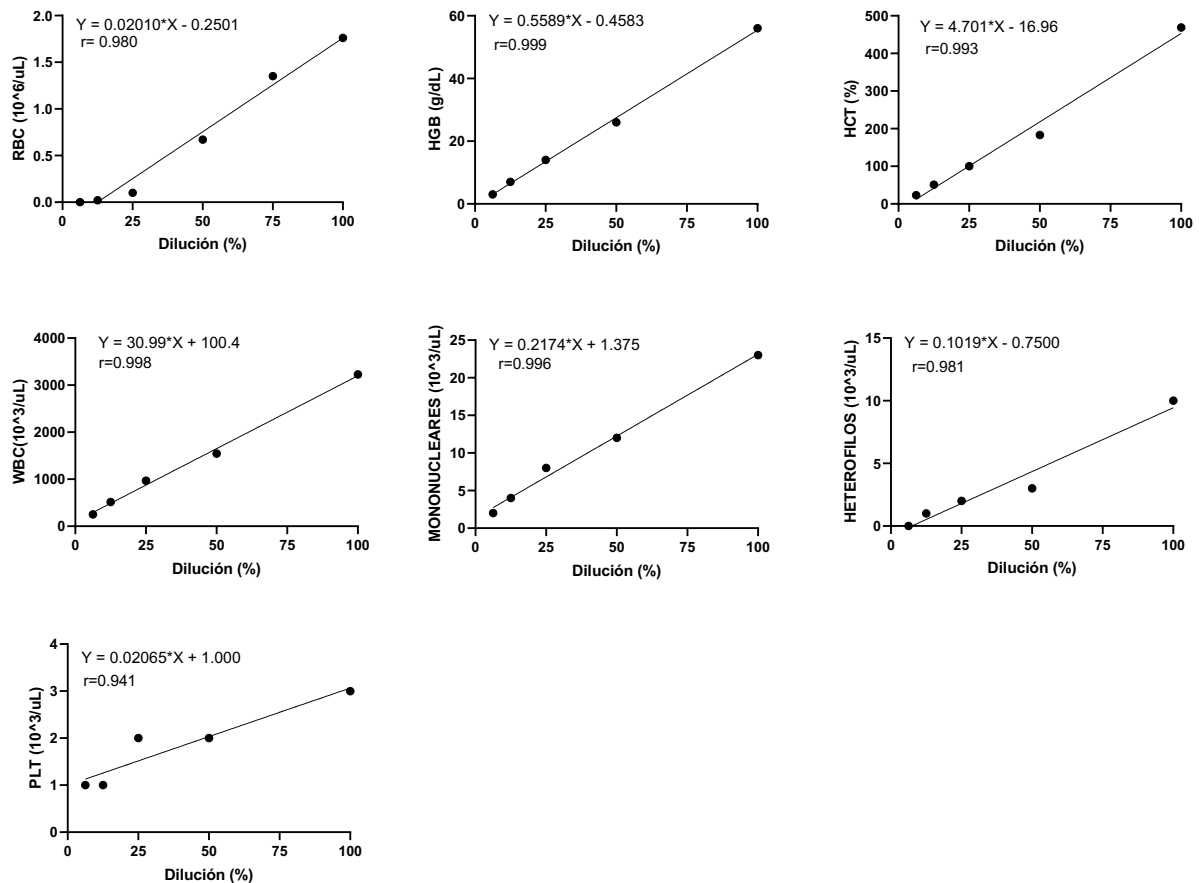


Figura 8. Linealidad y coeficiente de correlación de Pearson de los parámetros: Recuento de eritrocitos (RBC), Concentración de hemoglobina (HGB), Valor de hematocrito (HCT), Recuento de leucocitos (WBC), mononucleares, heterófilos y Trombocitos (PLT).

4.1.2. ARRASTRE (“CARRY-OVER”)

El arrastre para todos los parámetros fue 0, excepto para WBC que se situó en un 0,57 %.

En los citogramas de la Figura 9 se muestra el arrastre después de realizar el análisis de una muestra concentrada (H1), obtenida tras ser centrifugada y eliminar el plasma, seguida de una muestra poco concentrada (L1). En el citograma de la muestra poco concentrada, se observa una nube de puntos en la zona que corresponde a las poblaciones de leucocitos.

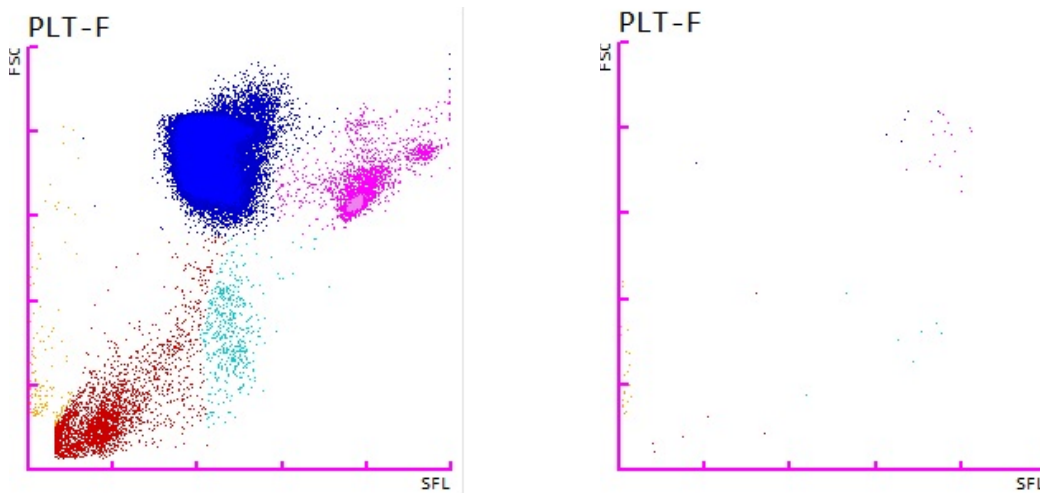


Figura 9. Citogramas del estudio del arrastre de una muestra concentrada (izquierda), seguida de una muestra poco concentrada (derecha).

4.1.3. PRECISIÓN

La precisión del Sysmex XN-1000V para las muestras de sangre de *O. mykiss* se realizó de acuerdo con las directrices del "International Council for Standardization in Haematology" (ICSH) (Briggs et al., 2014) para la evaluación de los analizadores hematológicos de células sanguíneas, con recuentos celulares normales y altos. Los resultados de la Tabla 2, mostraron valores de coeficiente de variación aceptables ($CV < 5 \%$) para todos los parámetros hematológicos estudiados en el Sysmex XN-1000V, excepto para el recuento de heterófilos en muestras con valores normales ($CV > 15 \%$).

Tabla 2. Estudio de la precisión del Sysmex XN-1000V para muestras de sangre de *Oncorhynchus mykiss* con recuentos celulares normales y altos.

PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS	NOMAL		ALTO	
	Media	CV (%)	Media	CV (%)
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	0,64	2,71	1,21	0,83
HGB (g/dL)	4,03	1,43	5,87	3,94
HCT (%)	26,87	1,07	58,57	1,78
MCV (fL)	361,50	1,39	ND	ND
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	27,35	4,82	47,06	4,66
Mononucleares (%)	87,07	2,24	ND	ND
Heterófilos (%)	12,93	15,08	ND	ND
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	2,00	0,35	5,00	0,12

RBC = Recuento de eritrocitos; HGB = Concentración de hemoglobina; HCT = Valor de hematocrito; MCV = Volumen corpuscular medio; WBC = Recuento de leucocitos; PLT = Trombocitos. CV = Coeficiente de variación; ND = No determinado.

El estudio de la precisión del método manual para el recuento celular de RBC y WBC fue realizado por dos observadores, resumido en la Tabla 3. El observador 2, con menor experiencia, obtuvo un coeficiente de variación más alto que el observador 1, más experimentado. La variabilidad para los dos observadores de forma conjunta fue alta, de alrededor del 20 %.

Tabla 3. Estudio de la precisión en el método manual para el recuento celular de muestras de sangre de *O. mykiss* por parte de dos observadores.

CÉLULAS SANGUÍNEAS	OBSERVADOR 1		OBSERVADOR 2		2 OBSERVADORES
	Media	CV (%)	Media	CV (%)	CV (%)
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	1,28	5,63	1,77	15,68	21,27
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	19,20	12,01	17,10	23,94	17,57

RBC = Recuento de eritrocitos; WBC = Recuento de leucocitos. CV = Coeficiente de variación

4.1.4. ESTABILIDAD

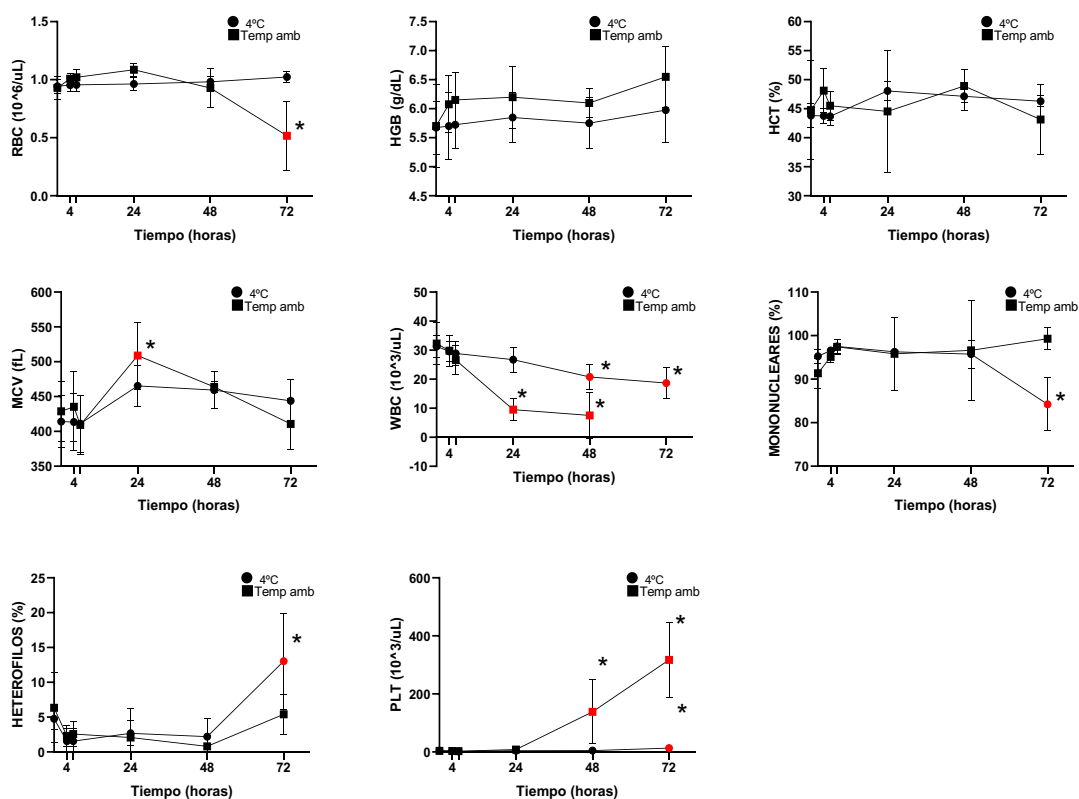
El recuento celular de WBC no se puede determinar después de 24 horas a temperatura ambiente y después de 48 horas en refrigeración a 4 °C, sin embargo, el recuento de RBC es estable durante 48 horas a temperatura ambiente y estable durante 72 horas para muestras refrigeradas a 4 °C (Figura 10). En el recuento celular de PLT no se observan diferencias

significativas en las primeras 24 horas, pero no se pueden determinar después de 48 horas a temperatura ambiente y después de 72 horas a 4 °C.

En cuanto al MCV, los eritrocitos experimentan su máxima expansión celular a las 24 horas a ambas temperaturas, aunque en menor grado a 4 °C. Después de las 24 horas el MCV disminuye considerablemente en las muestras de temperatura ambiente y las refrigeradas a 4 °C, debido a la lisis celular.

No se observaron diferencias significativas en las primeras 48 horas para los recuentos celulares de mononucleares y heterófilos para las muestras almacenadas a temperatura ambiente y las refrigeradas a 4 °C, pasado este período difieren, la concentración de mononucleares disminuye después de 72 horas en las muestras refrigeradas a 4 °C, mientras que los heterófilos aumentan después de 72 horas, siendo superior el aumento en las de 4 °C.

El aumento considerable de PLT se relaciona con la disminución de RBC y WBC; igual que ocurre con el aumento de heterófilos, mientras se produce una disminución considerable de los mononucleares.



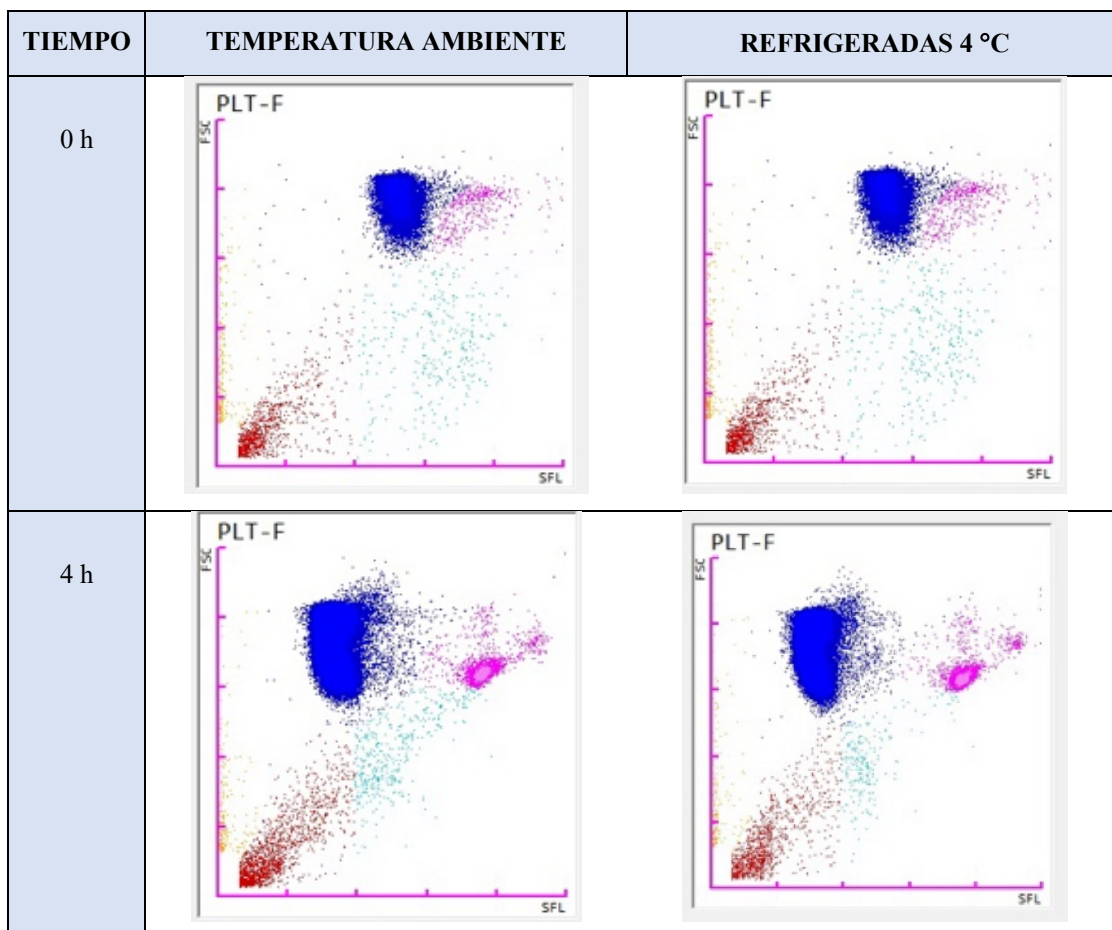
* Puntos críticos

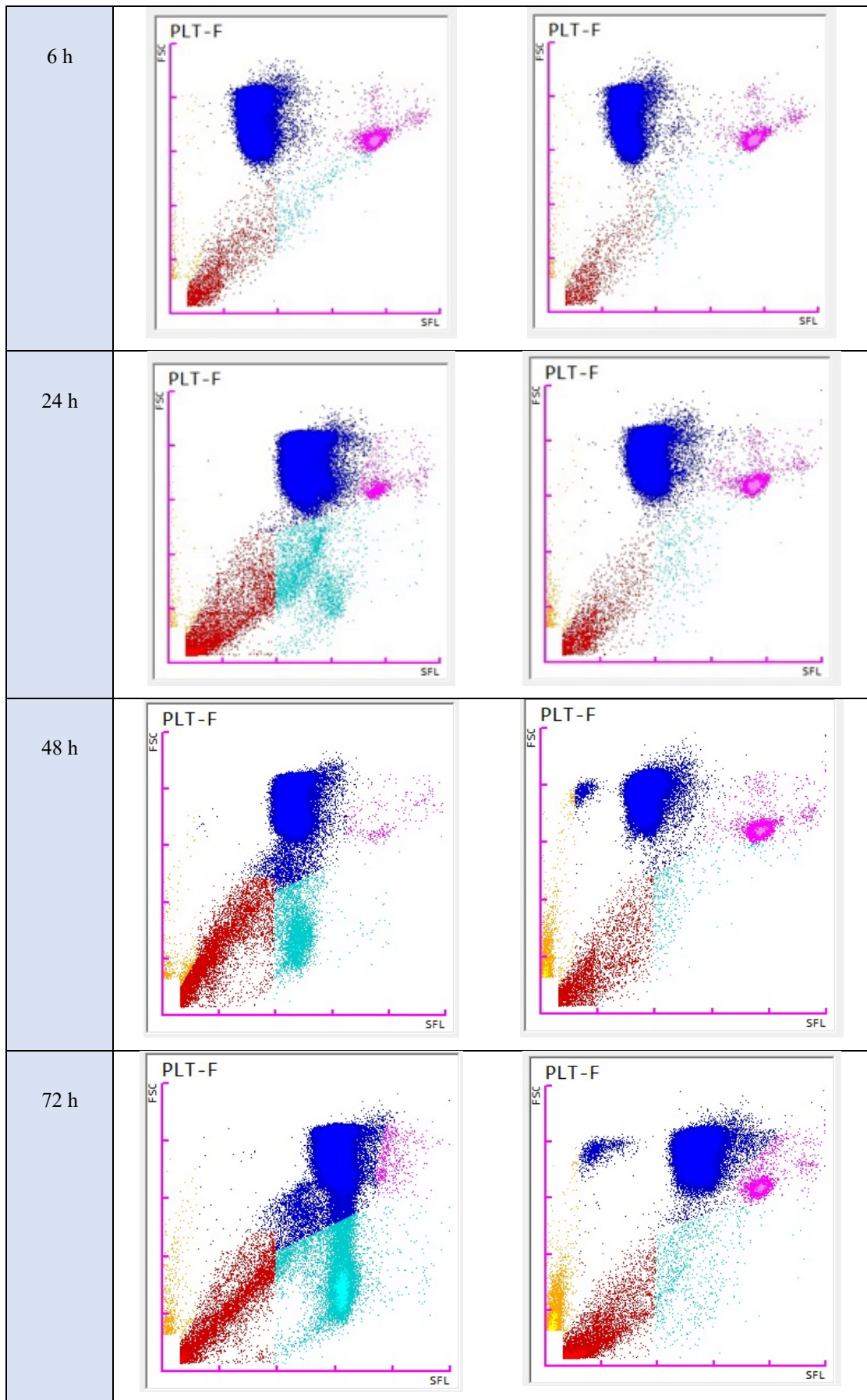
Figura 10. Estudio de la estabilidad de las muestras de *O. mykiss* a diferentes tiempos y temperaturas, para: Recuento de eritrocitos (RBC), Concentración de hemoglobina (HGB), Valor de hematocrito (HCT), Volumen corpuscular medio (MCV), Recuento de leucocitos (WBC), mononucleares, heterófilos y Trombocitos (PLT).

Los citogramas obtenidos por el Sysmex XN-1000V (Figura 11) de las muestras de sangre a diferentes tiempos y temperaturas muestran un aumento del MCV después de las 4 horas a temperatura ambiente y refrigeradas a 4 °C. A medida que aumenta el tiempo del análisis, aumenta la hemólisis y el detritus celular (rojo), especialmente en las muestras que se encuentran a temperatura ambiente, respecto a las que se conservan a 4 °C.

Las poblaciones de leucocitos (rosa) se van agrupando a medida que aumenta el tiempo del análisis, tanto las que se encuentran a temperatura ambiente como las refrigeradas a 4 °C. A partir de las 48 horas, las poblaciones de leucocitos que se encuentran a temperatura ambiente desaparecen debido a la lisis celular y se observa un aumento considerable de la hemólisis y el detritus celular.

En cuanto a los histogramas, el MCV se mantiene estable durante las primeras 24 horas para las muestras almacenadas a temperatura ambiente y las refrigeradas a 4 °C, pero después de este período se observa una deformación de los histogramas, más pronunciada en las muestras a temperatura ambiente, llegando a salir fuera de los valores del eje de las X (> de 500 fL).





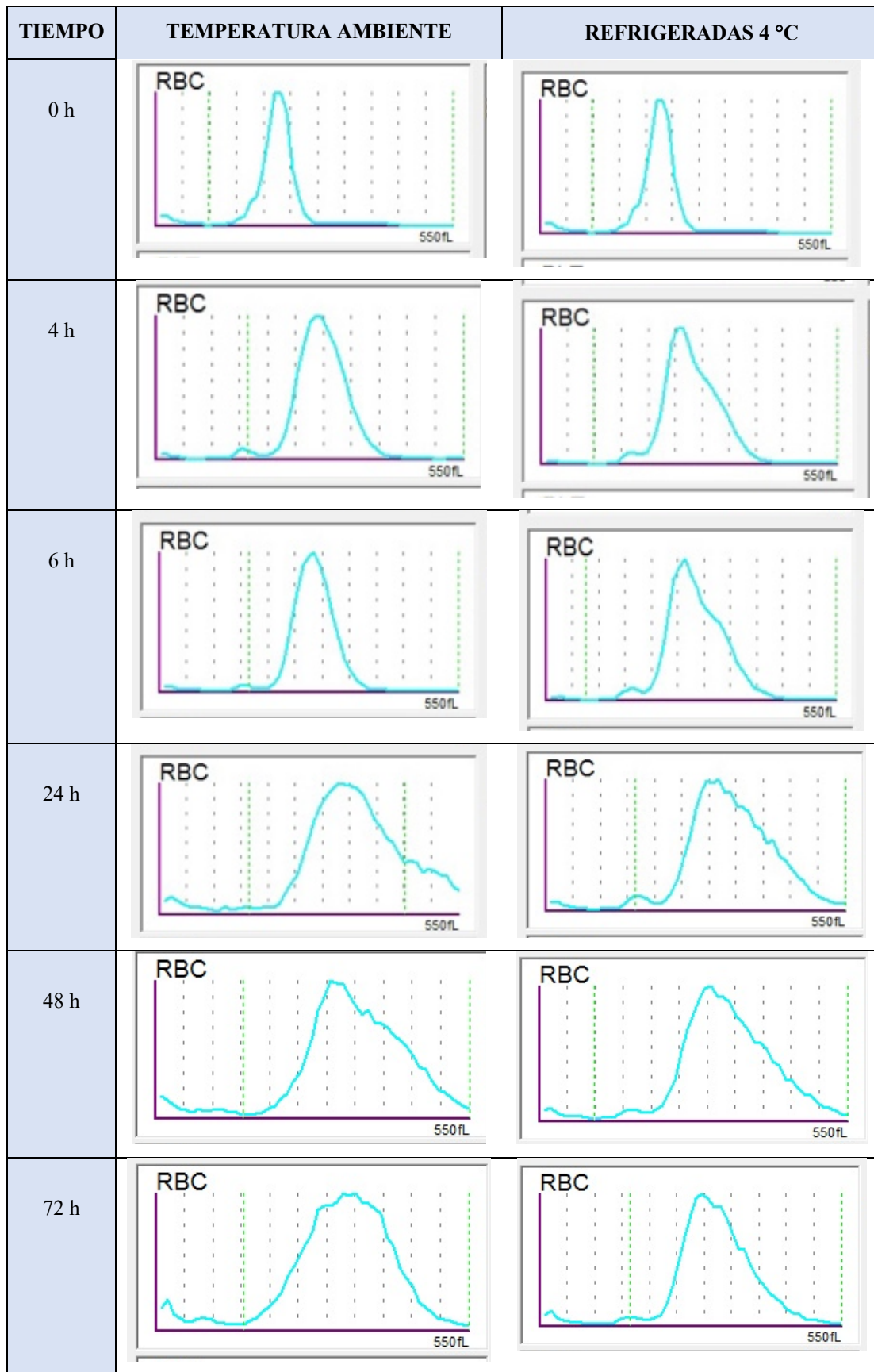


Figura 11. Citogramas e histogramas obtenidos por el Sysmex XN-1000V en las muestras de sangre de *O. mykiss* del estudio de la estabilidad, a diferentes tiempos y temperaturas.

4.1.5. COMPARACIÓN DE MÉTODOS

En la Tabla 4 se puede ver la comparación de métodos para el recuento celular entre el método automático (Sysmex XN-1000V) y el método manual (hemocitómetro y frotis sanguíneo) en muestras de sangre heparinizadas con un intervalo de confianza del 95 % del coeficiente de correlación de Spearman. La desviación es estadísticamente significativa e igual a cero ($p < 0,005$) para todos los parámetros, excepto para la estimación de las PLT que no es significativa.

La desviación en los valores obtenidos entre el método automático y el método manual, para el sesgo medio y el límite de concordancia, es alta para la mayoría de los parámetros, especialmente para el WBC, por lo que los valores obtenidos mediante un método no son matemáticamente iguales a los obtenidos con el otro método (Tabla 4, Figura 12).

Con las comparaciones entre los métodos hemos podido ver que existe una buena correlación entre los resultados obtenidos con el Sysmex XN-1000V, el recuento celular con el método manual a partir de un hemocitómetro y la estimación celular en el frotis sanguíneo. No obstante, la correlación entre los dos métodos (Tabla 4) es adecuada e incluso con la estimación manual sobre el frotis sanguíneo. Por lo que la tendencia de aumento o disminución de los parámetros hematológicos estudiados es similar en todos los métodos.

Tabla 4. Comparación de métodos para el recuento celular entre el Sysmex XN-1000V y el método manual.

PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS	N	PEARSON R	RANGO DE CORRELACIÓN DE SPEARMAN			LÍMITE DE CORRELACIÓN 95 % (SESGO)		
			p-valor	R	R 95 % CI	Sesgo medio	Bajo	Alto
RBC (Sysmex – Hemocitómetro)	97	0,780	< 0,0001	0,736	0,626 - 0,818	- 0,273	- 0,723	0,176
HCT (Sysmex – Microhematocrito)	91	0,869	< 0,0001	0,842	0,767 - 0,894	8,635	- 2,675	19,950
WBC (Sysmex – Hemocitómetro)	97	0,508	< 0,0001	0,696	0,573 - 0,789	- 19107	- 42050	3835
WBC (Sysmex – Frotis sanguíneo)	99	0,639	< 0,0001	0,818	0,737 - 0,875	- 18066	- 36646	513,700
PLT (Sysmex – Frotis sanguíneo)	99	- 0,098	< 0,0001	0,028	- 0,176 - 0,230	1,531	- 4,724	7,787
Mononucleares (%) (Sysmex – Frotis sanguíneo)	101	0,681	< 0,0001	0,600	0,454 - 0,715	7,834	- 17,770	33,440
Heterófilos (%) (Sysmex – Frotis sanguíneo)	99	0,756	< 0,0001	0,502	0,333 - 0,640	139,700	- 143,600	423,000
WBC manual vs estimado	95	0,687	< 0,0001	0,783	0,687 - 0,852	1116	- 16983	19216

(Hemocitómetro – Frotis sanguíneo)								
------------------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--

RBC = Recuento de eritrocitos; HCT = Valor de hematocrito; WBC = Recuento de leucocitos; PLT = Trombocitos.

El diagrama de Bland-Altman (Figura 12) muestra las diferencias de la determinación de los diferentes parámetros hematológicos entre el Sysmex XN-1000V y los métodos manuales (hemocitómetro y frotis sanguíneo), respecto la media de su determinación utilizando los dos métodos. Este diagrama permite evidenciar el tipo de error que existe en la determinación de un parámetro entre los dos métodos, permitiendo ver si el error es proporcional o aleatorio.

El diagrama de Bland-Altman mostró un error proporcional para los parámetros RBC, HCT, PLT y el WBC estimado por el frotis sanguíneo; mientras que el error es aleatorio para los parámetros WBC, mononucleares y heterófilos estimados por el método del recuento manual.

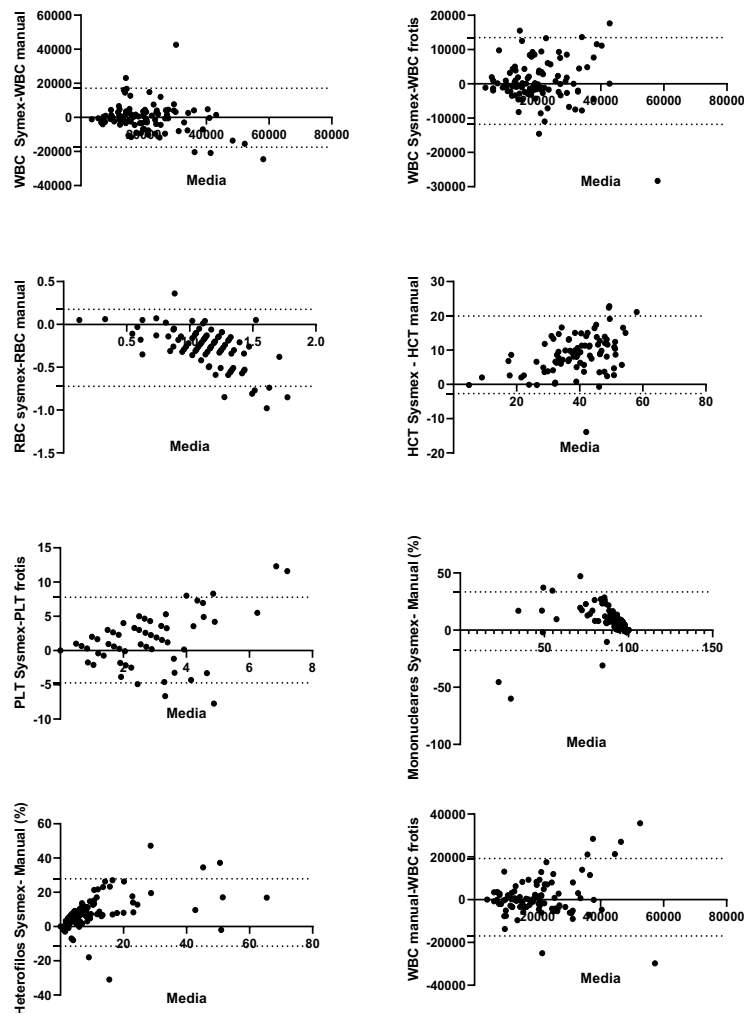


Figura 12. Diagramas de Bland-Altman para la comparación del Sysmex XN-1000V y el método manual (hemocitómetro y frotis sanguíneo) para: Recuento de eritrocitos (RBC), Valor de hematocrito (HCT), Recuento de leucocitos (WBC), mononucleares, heterófilos y Trombocitos (PLT). Los gráficos muestran la diferencia media (sesgo, línea punteada) entre ambos métodos y los límites de concordancia superior e inferior del 95 % (línea discontinua).

En los gráficos de Passing Bablok (Figura 13) se comparó el método automatizado con los métodos manuales para los parámetros hematológicos de RBC, HCT, WBC, mononucleares, heterófilos y PLT. En estos gráficos vemos representados gráficamente los valores obtenidos en la comparación de métodos y presentados en la Tabla 4. Con este estudio se puede observar que la mayoría de los parámetros siguen una misma tendencia y que ambos métodos se correlacionan bien, de forma que cuando aumentan los valores de un parámetro en un método, también lo hace en el otro método. Esto es así para todos los parámetros excepto para las PLT, en el que la relación entre el Sysmex XN-1000V y el método manual de estimación en frotis sanguíneo no es buena.

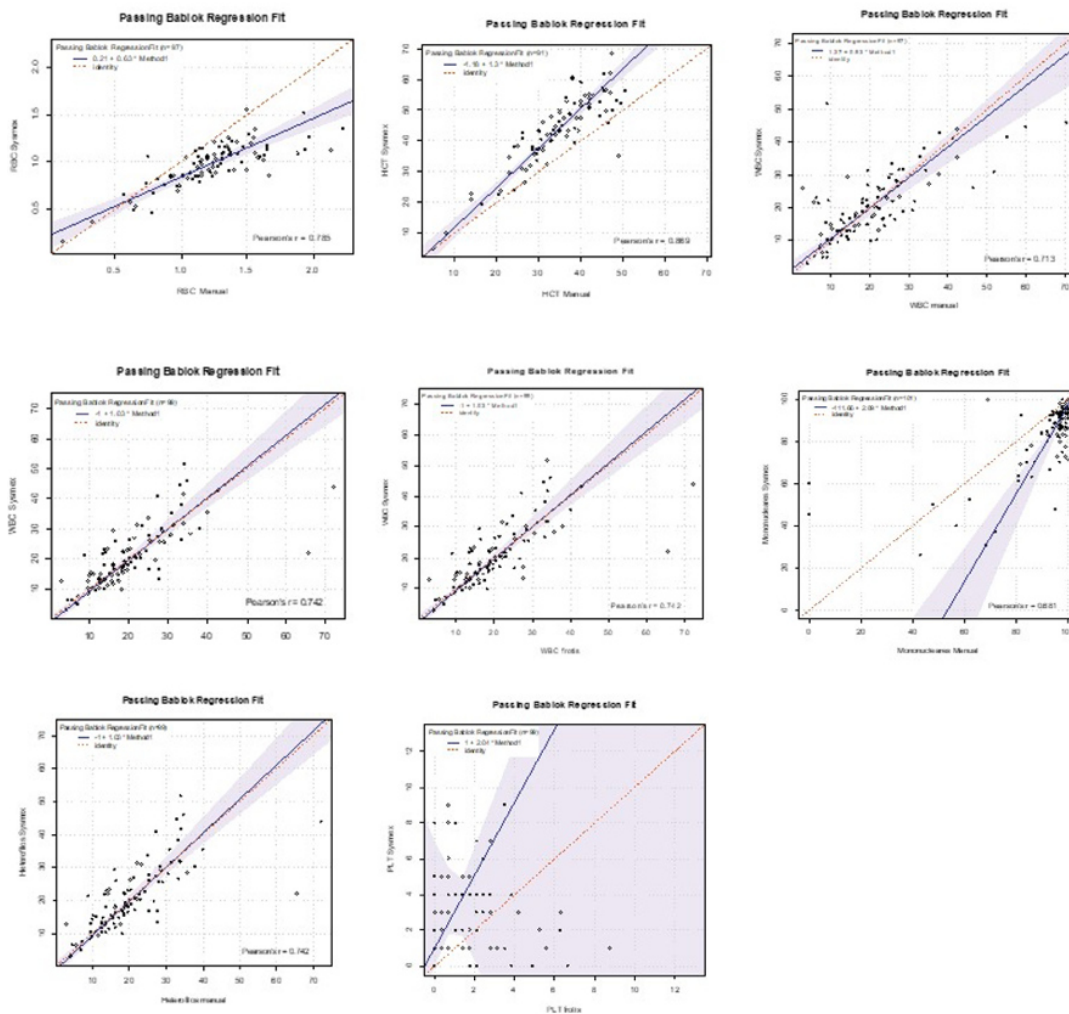
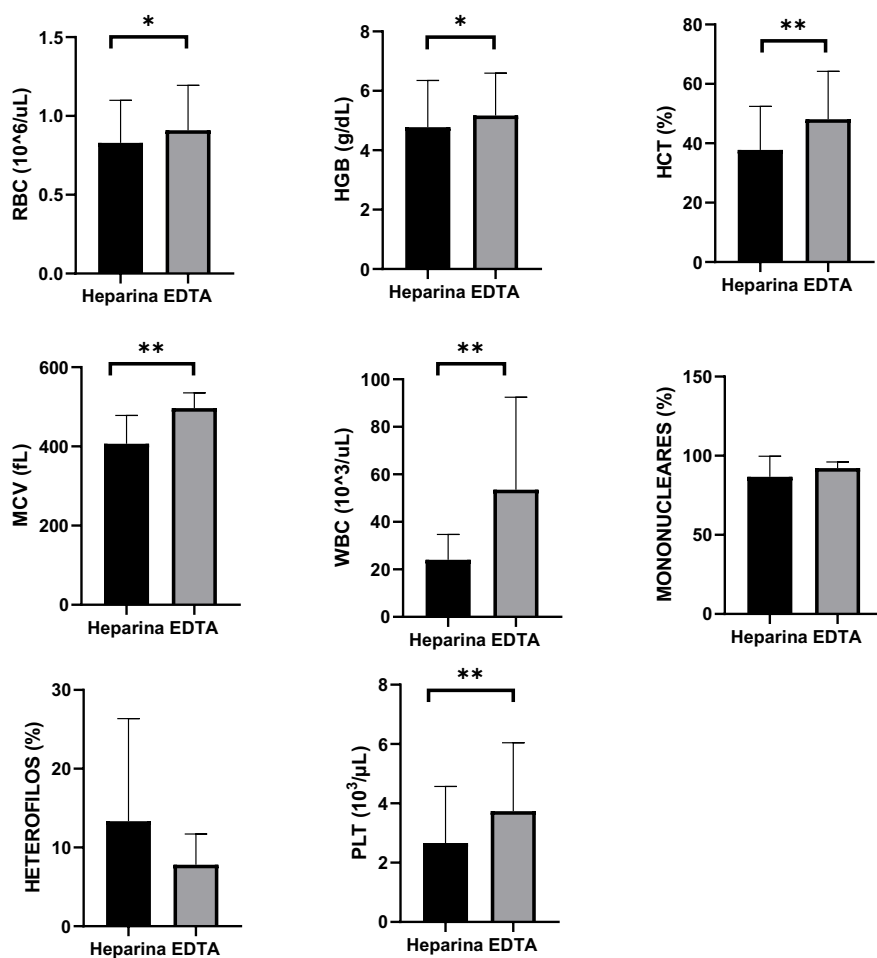


Figura 13. Gráficos de Passing Bablok de Regresión Fit para la comparación del Sysmex XN-1000V y el método manual (hemocitómetro y frotis sanguíneo para: Recuento de eritrocitos (RBC), Valor de hematocrito (HCT), Recuento de leucocitos (WBC), mononucleares, heterófilos y Trombocitos (PLT). Los gráficos muestran la dispersión de puntos alrededor de la recta de regresión y el sombreado representa el intervalo de confianza del 95 % de la recta de regresión.

4.2. ESTUDIO DEL TIPO DE ANTICOAGULANTE

Los gráficos de la Figura 14 muestran diferentes parámetros hematológicos conservados con dos tipos de anticoagulantes: heparina y EDTA. Las muestras de sangre con el anticoagulante EDTA presentan estadísticamente mayor RBC, HGB, HCT, MCV, WBC y PLT que las muestras con heparina.

En la clasificación de las dos poblaciones de WBC, las muestras con heparina presentan un mayor porcentaje de heterófilos, respecto a las muestras con EDTA, mientras que los mononucleares se mantienen en valores similares para ambos anticoagulantes.



* Valor de significación: $p < 0,05$
** Valor de significación: $p < 0,01$

Figura 14. Estudio entre los anticoagulantes heparina y EDTA en los parámetros hematológicos: Recuento de eritrocitos (RBC), Concentración de hemoglobina (HGB), Valor de hematocrito (HCT), Volumen corpuscular medio (MCV), Recuento de leucocitos (WBC), mononucleares, heterófilos y Trombocitos (PLT).

Los citogramas obtenidos por el Sysmex XN-1000V tras pasar una muestra de sangre con heparina (Figura 15A) y una muestra con EDTA (Figura 16A) de un mismo ejemplar del estudio, presentan características diferentes que pueden afectar a la diferenciación de los grupos celulares. En general, las muestras conservadas con heparina muestran un citograma con un RBC (azul) más compacto y una mejor separación entre RBC y WBC (rosa), en comparación con las muestras con EDTA. En la zona de detritus celulares (rojo) se observa una mayor presencia de artefactos, que dificulta el correcto recuento de PLT (verde) en las muestras con EDTA, respecto a las muestras con heparina.

El histograma de la muestra de sangre con EDTA (Figura 16B) tiene mayor MCV que el histograma con heparina (Figura 15B), porque provoca mayor hinchazón de los eritrocitos.

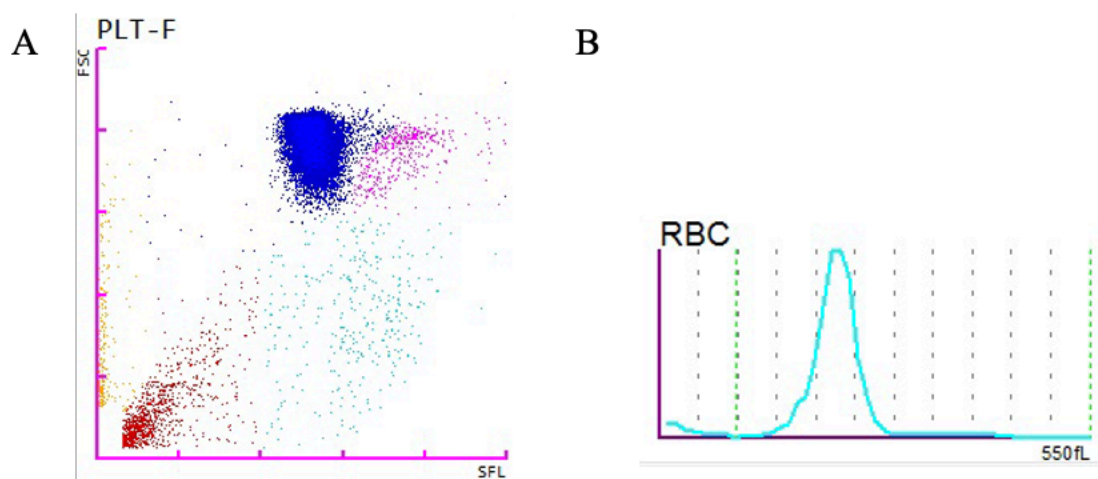


Figura 15A. Citograma de una muestra de sangre con heparina. **Figura 15B.** Histograma de una muestra con heparina.

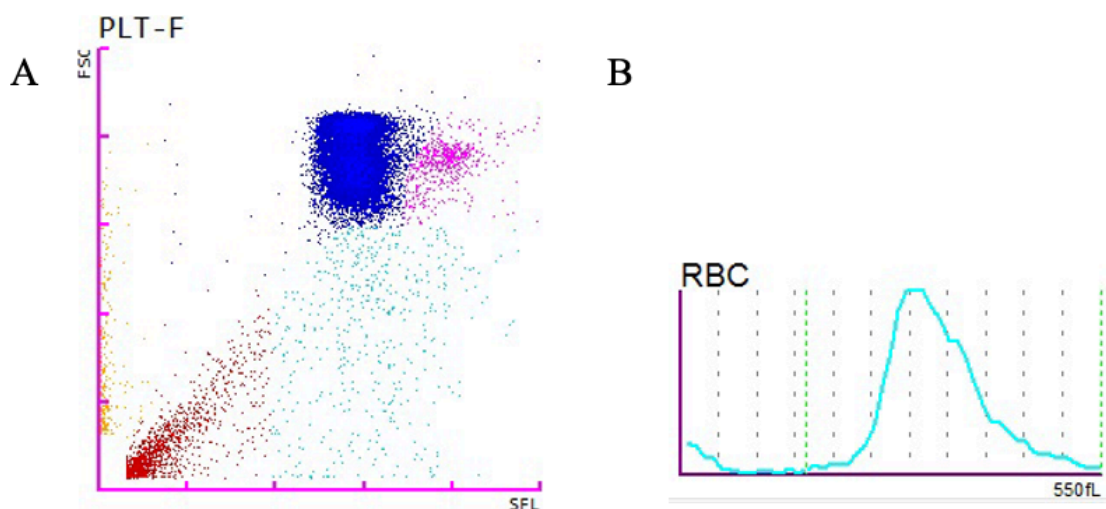
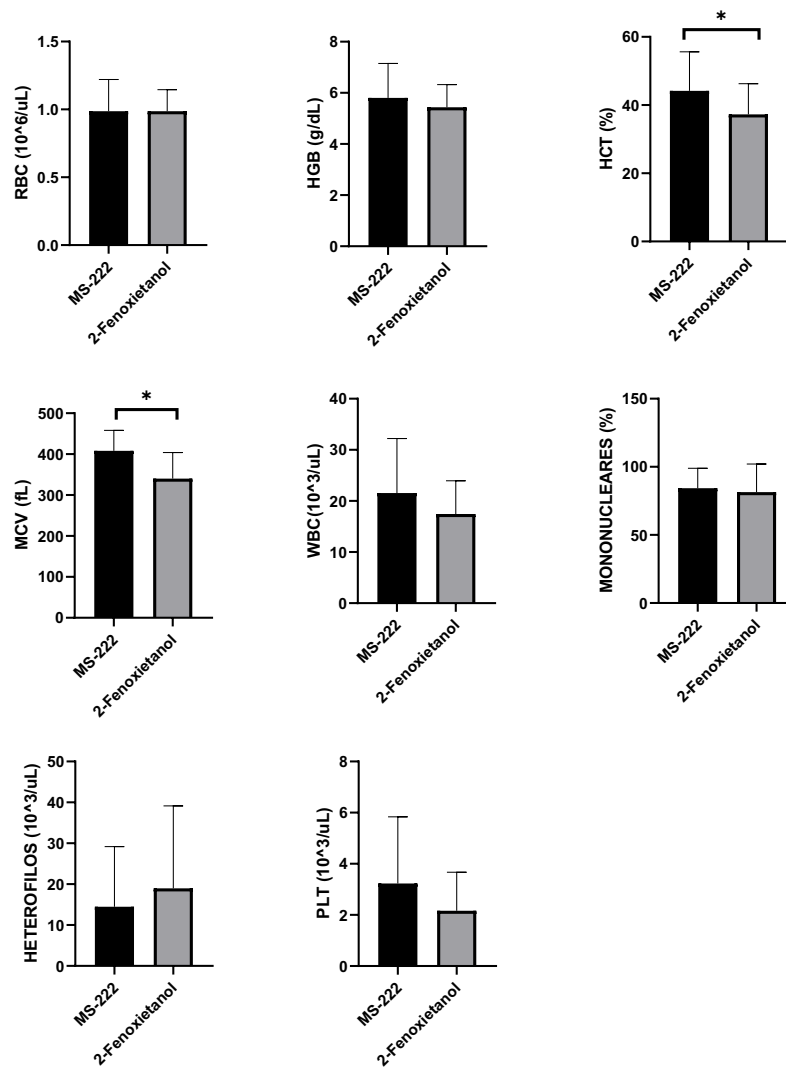


Figura 16A. Citograma de una muestra de sangre con EDTA. **Figura 16B.** Histograma de una muestra con EDTA.

4.3. ESTUDIO DEL TIPO DE ANESTESIA

Los peces del estudio que fueron anestesiados con el anestésico 2-fenoxietanol antes de la extracción de sangre, mostraron un valor de HCT y MCV menor respecto a las muestras de sangre de animales anestesiados con MS-222. Los otros parámetros hematológicos estudiados no mostraron diferencias significativas.



* Valor de significación: $p < 0,05$

Figura 17. Estudio entre el anestésico MS-222 y el 2-fenoxietanol para los parámetros hematológicos: Recuento de eritrocitos (RBC), Concentración de hemoglobina (HGB), Valor de hematocrito (HCT), Volumen corpuscular medio (MCV), Recuento de leucocitos (WBC), mononucleares, heterófilos y Trombocitos (PLT).

4.4. ESTUDIO DEL EFECTO DE LESIONES CUTÁNEAS SOBRE EL HEMOGRAMA

Los peces con lesiones cutáneas que se incluyeron en el estudio presentaban heridas muy visibles en la zona próxima a la aleta caudal, en la inserción de las aletas ventrales, el opérculo y escamación en el tejido (Figura 18), respecto a los peces del grupo control que no presentaban lesiones en el tejido, ni en las aletas ni en el opérculo (Figura 19).

PECES CON LESIONES CUTÁNEAS



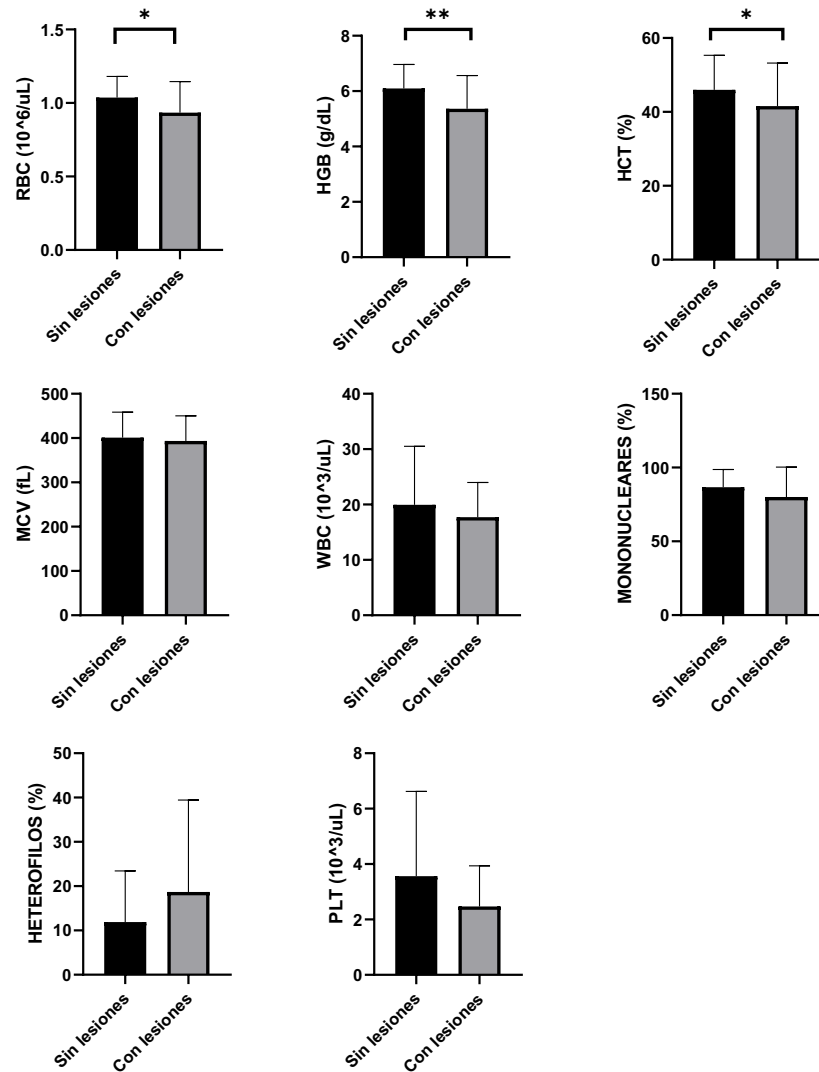
Figura 18. Fotografías de *O. mykiss* con presencia de lesiones cutáneas en la aleta caudal, el opérculo y la inserción de las aletas ventrales.

PECES SIN LESIONES CUTÁNEAS



Figura 19. Fotografías de *O. mykiss* sin presencia de lesiones cutáneas.

Los gráficos de la Figura 20 muestran que los peces con lesiones cutáneas tienen menor recuento de RBC, HGB, HCT, WBC y PLT que los peces control sin lesiones cutáneas; y mayor porcentaje de heterófilos, respecto a los que no presentan lesiones cutáneas, lo cual es un indicativo de la presencia de un inicio de anemia y de una respuesta inflamatoria.



* Valor de significación: $p < 0,05$

** Valor de significación: $p < 0,01$

Figura 20. Estudio del efecto de las lesiones cutáneas sobre el hemograma en peces con lesiones cutáneas en relación a los peces sin lesiones, para los parámetros hematológicos: Recuento de eritrocitos (RBC), Concentración de hemoglobina (HGB), Valor de hematocrito (HCT), Volumen corpuscular medio (MCV), Recuento de leucocitos (WBC), mononucleares, heterófilos y Trombocitos (PLT).

4.5. VALORES DE REFERENCIA

Los valores de referencia de este estudio (Tabla 5) se establecieron a partir de 71 muestras de sangre de los peces de *O. mykiss* anestesiados con el anestésico MS-222, utilizando la heparina como anticoagulante y sin evidencias de lesiones cutáneas.

Siguiendo las recomendaciones de la ASVCP, debido a que la mayoría de los parámetros hematológicos analizados no siguen una distribución normal, la media, mediana, mínimo, máximo y percentil 5 % y percentil 95 % se utiliza para definir la población (Arnold et al., 2019). El percentil 5 % y 95 % define el rango de referencia para la especie.

Tabla 5. Valores de referencia de los parámetros hematológicos del estudio de *O. mykiss*.

PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS	N	Media	Mediana	DS	Mínimo	Máximo	Percentil 5 %	Percentil 95 %
MÉTODO MANUAL <i>Recuento celular en hemocitómetro y tubos capilares de microhematocrito</i>								
RBC (10 ⁶ /μL)	71	1,35	1,32	0,33	0,57	2,22	0,63	1,93
WBC (10 ³ /μL)	71	22,50	19,40	14,12	2,80	70,40	3,19	50,45
HCT (%)	71	36,71	36,50	7,35	21,00	50,50	21,63	48,35
PT (g/dL)	71	3,96	4,00	0,86	1,70	5,30	1,78	5,00
MÉTODO MANUAL <i>Estimación en frotis sanguíneo</i>								
WBC (10 ³ /μL)	71	21,10	18,88	11,21	2,88	72,16	3,27	36,91
Mononucleares (%)	71	93,16	97,00	10,46	48,00	100,00	51,11	100,00
Linfocitos (%)	71	92,83	97,00	10,54	48,00	100,00	51,11	100,00
Monocitos (%)	71	0,33	0,00	0,94	0,00	6,00	0,00	2,00
Heterófilos (%)	71	6,84	3,00	10,46	0,00	52,00	0,00	31,55
Eosinófilos (%)	71	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Basófilos (%)	71	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PLT (10 ³ /μL)	71	1,12	0,70	1,36	0,00	6,65	0,00	3,50
MÉTODO ANALIZADOR AUTOMÁTICO <i>Sysmex XN-1000V</i>								
RBC (10 ⁶ /μL)	71	1,03	1,04	0,18	0,65	1,55	0,66	1,32
HGB (g/dL)	71	6,06	6,00	0,99	3,90	8,80	3,97	7,66
HCT (%)	71	41,10	41,02	8,69	20,96	60,91	22,79	53,12
MCV (fL)	71	412,79	411,55	48,35	308,00	540,00	313,73	487,39
MCH (pg)	71	54,29	54,05	5,88	38,90	73,80	40,11	65,70
MCHC (g/dL)	71	13,29	13,10	1,86	8,80	18,20	8,94	16,51
RDW-SD (fL)	71	39,66	38,40	12,60	18,40	73,20	18,66	60,20
RDW-CV (%)	71	13,28	13,05	3,37	7,10	20,90	7,20	18,98
WBC (10 ³ /μL)	71	22,39	21,44	10,91	2,88	51,64	3,59	43,37
Mononucleares (%)	71	84,39	88,70	14,62	30,80	100,00	33,97	100,00

Heterófilos (%)	71	14,43	10,40	14,64	0,00	69,20	0,00	48,92
WBC (10 ³ /μL)	71	23,49	22,50	11,22	2,00	53,00	3,04	44,55
Mononucleares (10 ³ /μL)	71	20,31	18,00	11,10	2,00	49,00	2,00	41,10
Heterófilos (10 ³ /μL)	71	3,03	2,00	2,72	0,00	12,00	0,00	9,00
PLT (10 ³ /μL)	71	3,34	3,00	2,78	0,00	13,00	0,00	8,55

RBC = Recuento de eritrocitos; HGB = Concentración de hemoglobina; HCT = Valor de hematocrito; PT = Proteínas plasmáticas totales; MCV = Volumen corpuscular medio; MCH = Hemoglobina corpuscular media; MCHC = Concentración de hemoglobina corpuscular media; WBC = Recuento de leucocitos; PLT = Trombocitos; RDW-SD = Desviación estándar del ancho de distribución de eritrocitos; RDW-CV = Coeficiente de variación del ancho de distribución de eritrocitos. (DS = Desviación estándar)

Para poder estimar los valores de referencia obtenidos en nuestro estudio de las muestras de sangre de *O. mykiss*, se recopilaron los valores hematológicos de esta especie publicados en otros artículos hasta la fecha (Tabla 6).

Tabla 6. Rangos de los valores descritos para los parámetros hematológicos de *O. mykiss* publicados en otros estudios.

ARTÍCULO	MÉTODO ANESTÉSICO ANTICOAGULANTE	N	RBC (10 ⁶ /μL)	WBC (10 ³ /μL)	HGB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)
Nabi et al., 2022	Manual MS-222 Heparina	148	1,16 ± 0,08	63,70 ± 14,72	9,30 ± 0,50	31,36 ± 1,45	270,06 ± 9,70	80,03 ± 1,74	29,65 ± 0,60
Farahnak Roudsari et al., 2021	Manual Eugenol Heparina	9	1,57 ± 0,05	4,20 ± 0,22	8,35 – 12,24	41,00 ± 1,63	261,67 ± 1,70	50,03 ± 0,68	19,13 ± 0,39
Bilen y Elbeshi, 2019	BC 3000 plus Manual-WBC Sin anestesia Heparina	36	0,89 ± 0,08	39,03 ± 1,80	7,95 ± 0,15	21,80 ± 1,90	245,45 ± 0,30	89,85 ± 6,35	-
Heydari et al., 2020	Manual Sin anestesia Heparina	15	0,95 ± 0,25	16,70 ± 0,27	10,00 ± 0,03	33,00 ± 0,76	347,25 ± 8,91	105,23 ± 10,18	30,38 ± 2,26
Hoseini et al., 2020	Manual Eugenol Heparina	6	0,89 ± 0,04	-	5,88 ± 0,26	33,30 ± 1,15	370,00 ± 57,30	65,70 ± 8,65	17,70 ± 2,25
Mışe Yonar, 2019	Manual Benzocaína Heparina	15	1,56 ± 0,07	-	6,98 ± 0,39	32,58 ± 2,29	209,61 ± 12,46	43,72 ± 2,53	22,24 ± 1,86
Yonar et al., 2019	Manual Benzocaína EDTA	8	1,60 ± 0,03	24,16 ± 2,17	7,04 ± 0,55	34,27 ± 2,10	216,47 ± 15,27	42,13 ± 3,22	20,03 ± 2,39
Fazio et al., 2017	HeCoVet C MS-222 EDTA	60	1,53 ± 0,13	20,10 ± 0,94	10,12 ± 1,99	29,00 ± 3,24	189,30 ± 12,25	65,62 ± 9,18	34,68 ± 4,44
Huyben et al., 2017	Manual MS-222 Heparina	12	0,78 ± 0,06	-	5,80 ± 0,20	19,80 ± 0,90	267,20 ± 19,10	78,60 ± 5,40	29,70 ± 1,00
Maqbool et al., 2014	Manual Sin anestesia Heparina	20	1,21 ± 0,05	12,45 ± 2,71	9,26 ± 0,55	35,38 ± 2,09	292,39 ± 8,69	76,53 ± 2,07	26,20 ± 1,42
Hrubec y Smith, 2010	Manual	122	0,77 – 1,67	-	1,50 – 7,70	21,00 – 44,00	192,00 – 420,00	14,40 – 70,00	5,60 – 24,40
Amend y Smith, 1975	Manual Benzocaína Heparina	20	1,33 ± 0,13	-	9,40 ± 0,20	47,00 ± 1,00	359,00 ± 11,00	72,00 ± 2,00	20,10 ± 0,40

RBC = Recuento de eritrocitos; WBC = Recuento de leucocitos; HGB = Concentración de hemoglobina; HCT = Valor de hematocrito; MCV = Volumen corpuscular medio; MCH = Hemoglobina corpuscular media; MCHC = Concentración de hemoglobina corpuscular media.

5. DISCUSIÓN

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio de validación del analizador hematológico Sysmex XN-1000V para muestras hematológicas de peces. La bibliografía existente hasta la fecha sobre estudios hematológicos en peces se basa en los resultados obtenidos mediante métodos manuales y no existen estudios específicos con valores de referencia suficientemente sólidos para todas las especies, lo que dificulta la interpretación de los resultados. La validación del Sysmex XN-1000V permitirá obtener un hemograma completo de forma rápida y precisa, estandarizar las técnicas analíticas, homogeneizar los resultados y obtener valores de referencia fiables, así como establecer un procedimiento reproducible para distintas especies de teleósteos.

Como se describe en los resultados, todos los parámetros hematológicos estudiados presentan linealidad y cumplen las recomendaciones de precisión del recuento celular que se establecen para los estudios hematológicos en humanos en analizadores automáticos ($CV < 5\%$), de acuerdo con las directrices del "International Council for Standardization in Haematology" (ICSH) (Briggs et al., 2014). Sólo se observa la excepción del valor de precisión en el recuento de heterófilos en muestras con valores normales, con un $CV > 15\%$, posiblemente por el bajo recuento de estas células en la especie estudiada. Además, el recuento de las poblaciones de leucocitos se determina mediante la ventana "extended", que tiene un ajuste manual y posiblemente por eso observamos más variación en este parámetro.

El estudio de la precisión del método manual revela la existencia de alta variabilidad entre los observadores, con un coeficiente de variación alrededor del 20% cuando se analiza de forma conjunta y siendo mayor en el observador menos experimentado respecto al observador con mayor experiencia. Según las directrices del ICSH, en medicina humana se aceptan recuentos celulares con un $CV < 20\%$ cuando se trata de recuentos realizados de forma manual. Esto reafirma la necesidad de validar analizadores automáticos como el Sysmex XN-1000V, ya que los resultados obtenidos en los recuentos manuales están sujetos a múltiples fuentes de error durante el proceso y a la correcta interpretación de los recuentos celulares, dependiendo en alto grado de la experiencia del observador, mientras que el analizador hematológico es más preciso.

El arrastre entre muestras es aceptable y el Sysmex XN-1000V tiene un sistema de lavado entre muestras que permite obtener resultados fiables. Nuestros resultados son inferiores al 1 %, que es lo aceptado en medicina humana por la ICSH (Briggs *et al.*, 2014).

5.1. ESTABILIDAD DE LAS MUESTRAS

En los estudios de hematología no siempre se pueden realizar los análisis en el momento de la recolección de las muestras de sangre, por eso es importante estudiar la estabilidad de las muestras teniendo en cuenta el tiempo transcurrido desde la extracción y la temperatura de conservación, para conocer cómo esto puede afectar a los parámetros hematológicos.

En el presente estudio, observamos que los WBC no se conservan tan bien como los RBC, ya que los WBC no se pudieron determinar a partir de las 24 horas en las muestras a temperatura ambiente ni a 48 horas en las muestras refrigeradas a 4 °C porque se produce lisis celular; mientras que los RBC se mantuvieron estables durante 48 horas para las muestras conservadas a temperatura ambiente y 72 horas en las refrigeradas a 4 °C.

Las muestras que se mantuvieron a temperatura ambiente fueron menos estables que las que se encontraban refrigeradas a 4 °C, lo que sugiere que el frío ayuda a mantener las estructuras celulares y a retrasar la degradación celular. Esto concuerda con Buttarello (2004), que afirma que el almacenamiento a 4 °C puede estabilizar las muestras durante 24 – 72 horas. Por otro lado, los estudios realizados por Fazio *et al.* (2012) y Faggio *et al.* (2013) confirman que el almacenamiento a largo plazo influye en el análisis de los parámetros hematológicos, recomendando que las muestras se analicen dentro de las 6 horas después de su obtención y preferiblemente refrigeradas a 4 °C.

Como se puede observar en los resultados de este estudio (Figura 10), los eritrocitos experimentaron un aumento en el MCV a las 24 horas debido a que los poros de la membrana se agrandaron, permitiendo la entrada de agua a las células e hinchándolas a medida que aumentaba el tiempo del análisis, siendo similar a lo descrito en el estudio de Fazio *et al.* (2017) con muestras de sangre de *O. mykiss*. Después, el MCV disminuyó considerablemente porque se desencadenaron los procesos de lisis y degradación celular, como en el estudio de Korcock *et al.* (1988) en muestras de *O. mykiss*. En conclusión, si bien las muestras presentan estabilidad variable para los diferentes parámetros hematológicos, parece recomendable,

siempre que sea posible, analizar las muestras en las primeras 24 horas post extracción y mantenerlas a temperatura de refrigeración mientras no sean analizadas.

5.2. COMPARACIÓN DE MÉTODOS

En los estudios comparativos realizados entre el método automático (Sysmex XN-1000V) y los métodos manuales (recuento celular en hemocitómetro y estimación en frotis sanguíneo) se ha podido observar que la mayoría de los parámetros siguen una misma tendencia y que ambos métodos tienen una buena correlación, pero no son equiparables, por lo que cuando aumenta o disminuye un parámetro hematológico en un método también lo hace en el otro, pero estos no son intercambiables. Lo cual significa que en los estudios experimentales no debemos sustituir un método por otro, sino que debemos utilizar el mismo método para todas las muestras del estudio. En hematología de peces, la bibliografía existente sobre la comparación de métodos es muy limitada, no hay estudios que evalúen el método manual y el uso de analizadores, quizás debido a la poca disponibilidad de analizadores hematológicos capaces de realizar recuentos celulares en especies con eritrocitos nucleados.

5.3. ESTUDIO DEL TIPO DE ANTICOAGULANTE

Las muestras de sangre del presente estudio tratadas con heparina presentaron mejor calidad que las muestras tratadas con EDTA, ya que tras ser analizadas en el Sysmex XN-1000V se observó una expansión celular de RBC, WBC y PLT en las muestras con el anticoagulante EDTA (Figura 16 A), además de un aumento en la hemólisis y el detritus celular, respecto a las muestras con heparina (Figura 15 A). Maqbool *et al.* (2014) y Korcock *et al.* (1988) demostraron que el EDTA provocaba un incremento en el MCV de los eritrocitos, facilitando su lisis y fragmentación celular, por lo que el uso del EDTA no sería tan recomendable. Esto concuerda con el estudio realizado por Walencik y Witeska (2007) en el que afirman que la heparina es el anticoagulante con menor riesgo de causar artefactos en las muestras de sangre de pez, mientras que el EDTA cambia la morfología de los glóbulos rojos e interfiere con el anestésico MS-222, que es el anestésico que se utilizó para anestésiar a la mayoría de los peces de este estudio. No obstante, la variación más importante observada es en el WBC, siendo los recuentos más altos en las muestras conservadas en EDTA que en heparina. Esto

fue debido a una peor separación entre las poblaciones de eritrocitos y leucocitos por la expansión de los eritrocitos, lo que provocó que se desplazan hacia la zona de los leucocitos y dificultara su determinación. Por tanto, los resultados obtenidos en este estudio no están en conformidad con los hallazgos de Faggio et al. (2014) en *M. cephalus*, que sugieren que el EDTA puede utilizarse con un analizador de impedancia eléctrica. La diferencia metodológica utilizada en los dos estudios, citometría de flujo versus impedancia puede ser la causa de esta discrepancia.

Para confirmar estas afirmaciones sería necesario realizar un estudio de estabilidad de las muestras con los dos anticoagulantes, para ver los efectos entre ambos y confirmar el daño celular del EDTA sobre los eritrocitos; o realizar pruebas de fragilidad osmótica. Estos estudios no se realizaron en el presente trabajo, el estudio de estabilidad de las muestras a diferente tiempo y temperatura se realizó con muestras con heparina.

5.4. ESTUDIO DEL TIPO DE ANESTESIA

En el presente estudio se utilizó el anestésico MS-222 para anestesiar a la mayoría de los peces, ya que es el anestésico más utilizado en peces según la bibliografía consultada, el más aceptado y el único aprobado por la FDA y por la EPA en la actualidad (Hrubec y Smith, 2010 y Weiss et al., 2010). El MS-222 es acidificante y debe tamponarse con bicarbonato de sodio, además es una solución que puede provocar la rotura de los eritrocitos si su concentración no es adecuada (Hrubec y Smith, 2010; Weiss et al., 2010 y Carter et al., 2011).

En el presente estudio, los peces anestesiados con MS-222 mostraron mayor MCV y HCT que los anestesiados con 2-fenoxietanol por el aumento del tamaño de los eritrocitos, pudiendo interferir en el recuento celular. Según Topic Popovic et al. (2012) y Deebani et al. (2019), en concentraciones elevadas, el MS-222 puede producir situaciones de hipoxia y aumentar la acidez del agua, provocando alteraciones en el equilibrio iónico y osmótico de los peces, haciendo que las muestras estén más hemoconcentradas. En nuestro caso, con las dosis utilizadas durante el estudio, no hemos observado hemoconcentración, pero sí un aumento del MCV. La posible interferencia del agente anestésico en peces es un tema poco estudiado pero Phuong et al. (2017) menciona en su trabajo que el anestésico interfiere con las células sanguíneas y puede aumentar el HCT, coincidiendo con lo observado en el presente estudio.

No se han observado cambios significativos en el recuento celular entre los dos anestésicos utilizados, sin embargo, los resultados obtenidos por Witeska et al. (2015) y Witeska et al. (2017) en *Cyprinus carpio* muestran que el anestésico 2-fenoxietanol provoca cambios hematológicos significativos en las muestras de sangre después de su obtención, desaconsejando su uso para la realización de estudios hematológicos.

5.5. UTILIDAD DEL HEMOGRAMA PARA DETECTAR PATOLOGÍAS Y ENFERMEDADES INFLAMATORIAS

En el estudio comparativo entre peces con lesiones cutáneas y peces sin lesiones, se observó un menor recuento celular de RBC, WBC y PLT en los peces con lesiones cutáneas, además de una mayor concentración de heterófilos. El menor recuento de eritrocitos puede deberse a las pequeñas pérdidas de sangre ocasionadas por las heridas, o bien por una anemia crónica debido a la presencia de procesos inflamatorios. Los leucocitos migran a los lugares de inflamación (Katakura et al., 2019) y en este caso, esta migración puede justificar la disminución observada en los peces con lesiones, a su vez, la tendencia al incremento de los heterófilos ayudaría a confirmar la presencia de un proceso inflamatorio.

En conclusión, con lo observado en esta parte del estudio del Sysmex XN-1000V podemos considerar que el analizador es capaz de detectar los cambios que se producen en los parámetros hematológicos de los peces con presencia de lesiones cutáneas, pudiendo ser de gran utilidad para conocer el estado de salud de los animales en otros estudios o incluso estudiar la respuesta hematológica a diferentes estímulos (tóxicos, infecciosos, etc.)

La interpretación del hemograma resulta de gran utilidad para el diagnóstico de algunas patologías como la anemia, la cual puede detectarse a partir de un bajo HCT y un alto MCV. Según el estudio de Tort (2011), a partir del hemograma también se pueden detectar niveles de estrés a corto plazo como resultado del aumento de leucocitos, aunque el estrés crónico generalmente causa leucopenia. El estrés también puede afectar al recuento del diferencial leucocitario, provocando un cambio de linfocitos a heterófilos y monocitos (Aguirre-Guzman et al., 2016).

5.6. VALORES DE REFERENCIA

Los valores de referencia de los parámetros hematológicos obtenidos a partir de las muestras de sangre de *O. mykiss*, se compararon con los intervalos publicados hasta el momento en varios estudios. Una de las limitaciones más importantes en peces es la ausencia de valores de referencia con métodos automatizados o manuales, ya que la mayoría de estudios muestran los valores de los parámetros hematológicos del grupo control, con un tamaño de individuos de estudio muy limitado; pero son escasos los trabajos específicos orientados al estudio de los valores de referencia en situaciones concretas, esto lleva a que exista una gran variabilidad en los resultados. Además, no existe hasta el momento una estandarización metodológica ni de factores establecidos como el tipo de anestésico o anticoagulante utilizado, lo cual se ha podido comprobar en la Tabla 6, donde se recopilan los parámetros hematológicos de algunos estudios publicados para *O. mykiss*.

Los valores de referencia obtenidos en este estudio (Tabla 5) siguen siendo unos valores con unos intervalos amplios, pero similares a los valores publicados por Nabi et al. (2022), Fazio et al. (2017) y Hrubec y Smith (2010) de la Tabla 6, los únicos con una N suficientemente grande y, por tanto, robusta a la hora de realizar comparaciones; pero estos valores sólo son orientativos, ya que la metodología, el tipo de anestésico o anticoagulante utilizados difieren, y en el presente estudio se ha podido comprobar que existen diferencias significativas entre el tipo de anestésico y anticoagulante utilizados para los parámetros hematológicos estudiados. Por eso, es recomendable que cada laboratorio obtenga sus propios valores de referencia o que se establezca una metodología estandarizada para los estudios futuros.

6. CONCLUSIONES

1. En el presente Trabajo de Final de Master se ha podido validar de forma satisfactoria el analizador automático Sysmex XN-1000V para el análisis hematológico de muestras de sangre de *O. mykiss*.
2. La validación del Sysmex XN-1000V permitirá estandarizar las técnicas analíticas existentes hasta el momento, homogeneizar los resultados y obtener valores de referencia para las distintas especies de peces, siendo muy importante para la práctica veterinaria, la investigación científica y la acuicultura.
3. Los métodos manuales requieren tener experiencia en el recuento celular para obtener resultados fiables, aun así, están sujetos a múltiples fuentes de error humano durante el proceso, por lo que los análisis hematológicos automatizados son más precisos y marcan un antes y un después en los estudios hematológicos.
4. Los estudios comparativos realizados entre el analizador hematológico y los métodos manuales presentan una buena correlación, pero no son intercambiables. En los estudios experimentales se debe utilizar el mismo método para todas las muestras del estudio.
5. Las muestras de sangre deben ser analizadas en el menor tiempo posible para evitar cambios morfológicos con el paso del tiempo. Mantener las muestras refrigeradas a 4 °C ayuda a mantener las estructuras celulares y a retrasar la degradación celular.
6. La heparina es un buen anticoagulante para las muestras de sangre de pez porque no interfiere en la morfología de las células sanguíneas de la forma en que lo hace el EDTA. Además, las muestras con heparina presentan menos hemólisis y detritus celular que las tratadas con EDTA, cuando se estudian con el analizador Sysmex XN-1000V.
7. El anestésico MS-222 y el 2-fenoxietanol pueden interferir en la morfología de los eritrocitos, pero es importante utilizarlos para reducir el estrés de los peces en el momento de su manipulación y desencadenar otros procesos fisiológicos.
8. El Sysmex XN-1000V es capaz de detectar los cambios que se producen en los parámetros hematológicos de los peces con presencia de lesiones cutáneas, por lo que

podemos decir que el uso de los valores hematológicos ayuda en la evaluación del estado de salud de los animales estudiados.

9. Conocer los valores de referencia de una especie es importante para la correcta interpretación de los resultados. Poner a punto el Sysmex XN-1000V permitirá obtener estos valores de referencia con la estandarización de la metodología utilizada, por lo que serán unos datos fiables y precisos.

7. CONCLUSIONS

1. In the present Master Thesis, the automatic hematological analyzer Sysmex XN-1000V has been successfully validated for the hematological analysis of *O. mykiss* blood samples.
2. The validation of the Sysmex XN-1000V will enable the standardization of the existing hematological analytical techniques in fish. Homogenizing the results and allowing us to obtain reference values for the different fish species, which are very important for veterinary medicine, scientific research and aquaculture.
3. Manual hematological methods require experience in cell count to obtain reliable results, and these results are still subject to multiple errors during the process. Automatic hematological analyzers are more precise and mark a before and after in hematological studies.
4. The comparative studies carried out between the automatic analyzer and the manual methods show a good correlation between methods, but that they are not interchangeable. Therefore, on experimental studies, the same method should be used for all the analyzed samples.
5. Blood samples must be analyzed in the shortest time possible to avoid morphological changes over time. Keeping samples refrigerated at 4 °C helps maintain cell structures and delays cell degradation.

6. Heparin is a good anticoagulant for fish blood samples because it does not interfere with blood cell morphology as EDTA does. In addition, heparin samples have less hemolysis and cell debris than EDTA samples, when these are studied with the Sysmex XN-1000V analyzer.
7. The anesthetics MS-222 and 2-phenoxyethanol can interfere with erythrocyte morphology, but it is important to use them to reduce the stress of the fish at the time of handling, which could lead to other detrimental physiological processes.
8. The Sysmex XN-1000V can detect the changes that occur in the hematological parameters of fish with skin lesions, so we can say that the use of hematological values helps in evaluation of fish health status.
9. Knowing the reference values of a species is important for the correct interpretation of hematological results. The Sysmex XN-1000V will help in establishing these reference values for different fish species, as the standardization of the methodology will provide reliable and accurate data.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre-Guzman, G., Carvajal-de-la-Fuente, V., Neri-Coronado, M., Loredó-Osti, J. y Rábago-Castro, J. L. 2016. Hematological and clinical chemistry changes induced by acute stress during handling and capture of catfish (*Ictalurus punctatus*). *Revista MVZ Córdoba*, 21(2): 5345-5354. <https://doi.org/10.21897/rmvz.601>
- Amend, D. F. y Smith, L. 1975. Pathophysiology of infectious hematopoietic necrosis virus disease in rainbow trout: Hematological and blood chemical changes in moribund fish. *Infection and Immunity*, 11(1): 171-179. <https://doi.org/10.1128/iai.11.1.171-179.1975>
- Arnold, J. E., Camus, M. S., Freeman, K. P., Giori, L., Hooijberg, E. H., Jeffery, U., Korchia, J., Meindel, M. J., Moore, A. R., Sisson, S. C., Vap, L. M. y Cook, J. R. 2019. ASVCP Guidelines: Principles of Quality Assurance and Standards for Veterinary Clinical Pathology (version 3.0): Developed by the American Society for Veterinary Clinical Pathology's (ASVCP) Quality Assurance and Laboratory Standards (QALS) Committee. *Veterinary Clinical Pathology*, 48(4): 542-618. <https://doi.org/10.1111/vcp.12810>
- Bilen, S. y Elbeshti, H. T. A. G. 2019. A new potential therapeutic remedy against *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using tetra, *Cotinus coggygria*. *Journal of Fish Diseases*, 42(10): 1369-1381. <https://doi.org/10.1111/jfd.13061>
- Buttarelo, M. 2004. Quality specification in haematology: The automated blood cell count. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 346(1): 45-54. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2004.02.038>
- Carter, K. M., Woodley, C. M. y Brown, R. S. 2011. A review of tricaine methanesulfonate for anesthesia of fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 21(1): 51-59. <https://doi.org/10.1007/s11160-010-9188-0>
- Claver, J. A. y Quaglia, A. I. E. 2009. Comparative Morphology, Development, and Function of Blood Cells in Nonmammalian Vertebrates. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 18(2): 87-97. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2009.04.006>
- COSEWIC. 2014. COSEWIC Assessment and status report on the Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* in Canada. Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada. Dr. John Post, 60 pp Ottawa, Canada.
- Deebani, A., Iyer, N., Raman, R. y Jagadeeswaran, P. 2019. Effect of MS-222 on Hemostasis in Zebrafish. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*, 58(3): 390-396. <https://doi.org/10.30802/AALAS-JAALAS-18-000069>
- Del Santo O'Neill, T., Jerez-Cepa, I., Castro, M. y Mancera, J. 2016. Efecto del anestésico MS-222 (tricaina metanosulfonato) sobre el sistema del estrés en juveniles de dorada (*Sparus aurata*).
- Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, pertinente a efectos del EEE. (s.d.). 47.
- Douglas, J.W., Weiss, K. y Wardrop, J. 2010. Schalm's Veterinary Hematology, 6th Eds. Wiley-Blackwell, USA.
- Faggio, C., Arfuso, F., Piccione, G., Zumbo, A. y Fazio, F. 2014. Effect of storage time on haematological parameters in mullet, *Mugil cephalus*. *Cell Biochemistry and Function*, 31: 412-416 https://doi.org/10.4194/1303-2712-v14_3_03
- Faggio, C., Casella, S., Arfuso, F., Marafioti, S., Piccione, G. y Fazio, F. 2013. Effect of storage time on haematological parameters in mullet, *Mugil cephalus*. *Cell Biochemistry and Function*, 31(5): 412-416.

<https://doi.org/10.1002/cbf.2915>

- Fänge, R. 1994. Blood cells, haemopoiesis and lymphomyeloid tissues in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 4(6): 405-411. <https://doi.org/10.1006/fsim.1994.1036>
- FAO. 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture Contributing to food security and nutrition for all. FAO. <https://www.fao.org/documents/card/es/c/b5dda8e3-f351-4559-8b4a-9723a97fec88/>
- FAO Yearbook. 2019. Fishery and Aquaculture Statistics. Statistiques des peches et de l'aquaculture. Estadísticas de pesca y acuicultura 2017. FAO Anuario. Estadística de pesca y acuicultura. FAO, 109p. Rome, Italia. Recuperado 25 junio 2022, de <https://www.fao.org/documents/card/es/c/ca5495t/>
- Farahnak Roudsari, S., Rajabi Islami, H., Mousavi, S. A., & Shamsaie Mehrgan, M. (2021). Folic Acid-Coated Nanochitosan Ameliorated the Growth Performance, Hematological Parameters, Antioxidant Status, and Immune Responses of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fvets.2021.647722>
- Fazio, F. 2019. Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: A review. *Aquaculture*, 500: 237-242. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.030>
- Fazio, F., Ferrantelli, V., Saoca, C., Giangrosso, G. y Piccione, G. 2017. Stability of haematological parameters in stored blood samples of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *Veterinárni Medicina*, 62(7): 401-405. <https://doi.org/10.17221/51/2017-VETMED>
- Fazio, F., Filiciotto, F., Marafioti, S., Di Stefano, V., Assenza, A., Placenti, F., Buscaino, G., Piccione, G. y Mazzola, S. 2012. Automatic analysis to assess haematological parameters in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 45(1): 63-73. <https://doi.org/10.1080/10236244.2012.677559>
- Fazio, F., Marafioti, S., Torre, A., Sanfilippo, M., Panzera, M. y Faggio, C. 2013. Haematological and serum protein profiles of *Mugil cephalus*: Effect of two different habitats. *Ichthyological Research*, 60(1): 36-42. <https://doi.org/10.1007/s10228-012-0303-1>
- Field, J. B., Elvehjem, C. A. y Juday, C. 1943. A study of the blood constituents of carp and trout. *Journal of Biological Chemistry*, 148(2): 261-269. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)72280-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)72280-1)
- Heydari, M., Firouzbakhsh, F. y Paknejad, H. 2020. Effects of *Mentha longifolia* extract on some blood and immune parameters, and disease resistance against yersiniosis in rainbow trout. *Aquaculture*, 515, 734586. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734586>
- Hoseini, S. M., Taheri Mirghaed, A., Ghelichpour, M., Pagheh, E., Iri, Y. y Kor, A. 2020. Effects of dietary tryptophan supplementation and stocking density on growth performance and stress responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 519, 734908. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734908>
- Hrubec, T. C., Smith, S. A. y Robertson, J. L. 2001. Age-Related Changes in Hematology and Plasma Chemistry Values of Hybrid Striped Bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). *Veterinary Clinical Pathology*, 30(1): 8-15. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2001.tb00249.x>
- Hrubec, T. C. y Smith, S. A. 2010. Hematology of fishes. Schalm's Veterinary Hematology In: Weiss, D.J., Wardrop, K.J. 2n Eds. Wiley-Blackwell, 298-312. Iowa, USA
- Huyben, D., Vidakovic, A., Nyman, A., Langeland, M., Lundh, T. y Kiessling, A. 2017. Effects of dietary yeast inclusion and acute stress on post-prandial whole blood profiles of dorsal aorta-cannulated rainbow trout. *Fish Physiology and Biochemistry*, 43(2): 421-434. <https://doi.org/10.1007/s10695-016-0297-0>

- International Council for Standardization in Haematology (ICSH), Writing group: Briggs, C., Culp, N., Davis, B., d'Onofrio, G., Zini, G. y Machin, S. J. 2014. International Council for Standardization of Haematology. ICSH guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting. *International Journal of Laboratory Hematology*, 36(6): 613-627. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12201>
- Katakura, F., Nishiya, K., Wentzel, A. S., Hino, E., Miyamae, J., Okano, M., Wiegertjes, G. F. y Moritomo, T. 2019. Paralogs of Common Carp Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) Have Different Functions Regarding Development, Trafficking and Activation of Neutrophils. *Frontiers in Immunology*, 0. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00255>
- King V, W., Hooper, B., Hillsgrove, S., Benton, C. y Berlinsky, D. L. 2005. The use of clove oil, metomidate, tricaine methanesulphonate and 2-phenoxyethanol for inducing anaesthesia and their effect on the cortisol stress response in black sea bass (*Centropristis striata* L.). *Aquaculture Research*, 36(14): 1442-1449. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01365.x>
- Korcock, D. E., Houston, A. H. y Gray, J. D. 1988. Effects of sampling conditions on selected blood variables of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Journal of Fish Biology*, 33(2): 319-330. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1988.tb05474.x>
- Magnadóttir, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2): 137-151. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.006>
- Maqbool, A., Ahmed, I. y Sheikh, Z. 2014. Effects of two commonly used anticoagulants on haematology and erythrocyte morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 2: 239-243.
- Mişe Yonar, S. 2019. Growth performance, haematological changes, immune response, antioxidant activity and disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diet supplemented with ellagic acid. *Fish & Shellfish Immunology*, 95: 391-398. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.10.056>
- Nabi, N., Ahmed, I. y Wani, G. B. 2022. Hematological and serum biochemical reference intervals of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* cultured in Himalayan aquaculture: Morphology, morphometrics and quantification of peripheral blood cells. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(4): 2942-2957. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.01.019>
- Parrino, V., Cappello, T., Costa, G., Cannavà, C., Sanfilippo, M., Fazio, F. y Fasulo, S. 2018. Comparative study of haematology of two teleost fish (*Mugil cephalus* and *Carassius auratus*) from different environments and feeding habits. *The European Zoological Journal*, 85(1): 193-199. <https://doi.org/10.1080/24750263.2018.1460694>
- Phuong, L. M., Damsgaard, C., Huong, D. T. T., Ishimatsu, A., Wang, T. y Bayley, M. 2017. Recovery of blood gases and haematological parameters upon anaesthesia with benzocaine, MS-222 or Aqui-S in the air-breathing catfish *Pangasianodon hypophthalmus*. *Ichthyological Research*, 64(1): 84-92. <https://doi.org/10.1007/s10228-016-0545-4>
- Ross, L. G. y Ross, B. 2008. Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals, 3r Eds. Eastbourne: Blackwell Publishing.
- Shah, S. 2010. Impairment in the haematological parameters of tench (*Tinca tinca*) infected by *Saprolegnia* spp. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 34: 313-318. <https://doi.org/10.3906/vet-0706-4>
- Shah, S. L. y Altinda, A. 2005. Alterations in the immunological parameters of tench (*Tinca tinca* L. 1758) after acute and chronic exposure to lethal and sublethal treatments with mercury, cadmium and lead. *Turkish Journal of Veterinary y Animal Sciences*, 29(1): 1163-1168

- Singh, A. K. (2020). Emerging scope, technological up-scaling, challenges and governance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) production in Himalayan region. *Aquaculture*, 518: 734-826. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734826>
- Smith, V. J., Brown, J. H. y Hauton, C. 2003. Immunostimulation in crustaceans: Does it really protect against infection? *Fish & Shellfish Immunology*, 15(1): 71-90. [https://doi.org/10.1016/S1050-4648\(02\)00140-7](https://doi.org/10.1016/S1050-4648(02)00140-7)
- Stanković, D., Crivelli, A. J. y Snoj, A. 2015. Rainbow Trout in Europe: Introduction, Naturalization, and Impacts. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 23(1): 39-71. <https://doi.org/10.1080/23308249.2015.1024825>
- Tavares-Dias, M. y Oliveira, S. R. 2009. A review of the blood coagulation system of fish. *Revista Brasileira de Biociências*, 7(2): Article 2. <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1144>
- Topic Popovic, N., Strunjak-Perovic, I., Coz-Rakovac, R., Barisic, J., Jadan, M., Persin Berakovic, A. y Sauerborn Klobucar, R. 2012. Tricaine methane-sulfonate (MS-222) application in fish anaesthesia. *Journal of Applied Ichthyology*, 28(4): 553-564. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2012.01950.x>
- Tort, L. 2011. Stress and immune modulation in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12): 1366-1375. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.07.002>
- Walencik, J. y Witeska, M. 2007. The effects of anticoagulants on hematological indices and blood cell morphology of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(3): 331-335. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.04.004>
- Weber, R., Peleteiro, J., Chereguini, O., García, L. y Aldegunde, Y. 2007. Evaluación de la eficacia del 2-fenoxietanol como anestésico en el lenguado (*Solea senegalensis*, Kaup, 1858). *ResearchGate*, XI Congreso Nacional de Acuicultura.
- Weiss, D. J., Wardrop, K. J. y Schalm, O. W. 2010. *Schalm's veterinary hematology*. Wiley-Blackwell.
- Witeska, M., Dudyk, J. y Jarkiewicz, N. 2015. Haematological effects of 2-phenoxyethanol and etomidate in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 42(5): 537-546 <https://doi.org/10.1111/vaa.12242>
- Witeska, M., Kondera, E., Ługowska, K. y Bojarski, B. 2022. Hematological methods in fish – Not only for beginners. *Aquaculture*, 547: 737498. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737498>
- Witeska, M., Teodorczuk, B. y Ługowska, K. 2017. Hematological effects of etomidate and tricaine in common carp. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 41(1): 93-98. <https://doi.org/10.3906/vet-1603-30>
- Yonar, M. E., Mişe Yonar, S., Ispir, U. y Ural, M. S. 2019. Effects of curcumin on haematological values, immunity, antioxidant status and resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Aeromonas salmonicida* subsp. *Achromogenes*. *Fish & Shellfish Immunology*, 89: 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.03.038>